

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

**ÉTUDE DE L'APOD DANS UN MODÈLE NEURODÉGÉNÉRATIF
INDUIT PAR L'ACIDE KAÏNIQUE**

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE**

PAR

AZADEH ALIKASHANI

FÉVRIER 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 -Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier mon directeur de recherche Pr. Éric Rassart pour m'avoir offert une place au sein de son équipe. J'exprime également mes remerciements au Pr. François Dragon pour ses précieux enseignements qui m'ont permis d'acquérir un bon esprit de synthèse. Je remercie la Pr. Elsy Edouard pour sa disponibilité ainsi que Dr. Sonia DoCarmo pour m'avoir encadrée tout le long de ma maîtrise. Un grand merci à Fadila Larguet pour ses encouragements chaleureux et ses conseils amicaux, en un mot merci pour son amitié qui m'a été précieuse pendant cette maîtrise. Je tiens à remercier également tous les membres du laboratoire auxquels j'ai eu à poser des questions, particulièrement Louis-Charles Levros. Merci à mon amie Michèle Prévost pour ses précieuses suggestions ainsi que Ouliana Souchkova pour l'affectueuse amitié dont elle m'a toujours fait preuve.

Au delà des murs de l'Université il existe une vie dans laquelle j'ai pu compter sur Zohreh ma mère, Elham ma sœur, mon frère Armin, mon beau frère Alireza, ma meilleure amie Shokraneh et surtout mon amoureux Jimmy avec qui je partage ma vie. Je les remercie particulièrement pour leur irremplaçable et inconditionnel soutien.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
LISTE DES SYMBOLES	xi
RÉSUMÉ	xii

CHAPITRE I

INTRODUCTION	1
1. ÉTAT DES CONNAISSANCES	1
1.1 Le gène de l'apolipoprotéine D	1
1.2 La protéine apolipoprotéine D	2
1.3 Expression tissulaire et cellulaire de l'apoD	3
1.4 Apolipoprotéine D et ses ligands	4
1.4.1 Le Cholestérol	4
1.4.2 Les hormones stéroïdes	5
1.4.3 La bilirubine	5
1.4.4 L'acide E-3-Méthyle-2 hénexoïque	6
1.4.5 L'acide arachidonique	6
1.5 Les facteurs régulant l'expression d'apoD	6
1.6 L'apoD et le métabolisme	7
1.7 L'apoD et la myélinisation	7
1.8 L'apoD dans le développement	8
1.9 L'apoD et le stress oxydatif	8
1.10 L'apoD et le cancer	10
1.11 L'apoD dans les neuropathologies	11

1.11 L'apoD dans les neuropathologies	11
1.12 Les souris transgéniques	13
1.13 L'acide kaïnique	14
1.13.1 Le glutamate	14
1.13.2 L'acide kaïnique et son activité excitatrice	14
1.13.3 L'acide kaïnique et l'apoD	16

CHAPITRE II

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	20
2.1 Injection	20
2.2 Prélèvement du cerveau	21
2.3 Analyse de l'expression de l'ARNm	21
2.3.1 Extraction d'ARN des tissus de souris	21
2.3.2 Électrophorèse d'ARN sur gel d'agarose	21
2.3.3 Transfert d'ARN de type Northern	22
2.3.4 Extraction de l'ADNc d'apoD à partir d'un plasmide	22
2.3.5 Préparation d'une sonde moléculaire radioactive	22
2.3.6 Hybridation de membrane avec une sonde radioactive	22
2.4 RT-PCR semi quantitative pour analyser l'ARNm d'apoD souris, humain, GFAP, COX-2 et actine	23
2.5 Analyse de l'expression de la protéine apoD endogène et transgène (apoD humaine) chez les souris transgéniques et les souris de type sauvage. .	24
2.5.1 Extraction des protéines du cerveau de souris	24
2.5.2 Électrophorèse des protéines sur le gel de polyacrylamide-dénaturant (SDS-PAGE)	25
2.5.3 Transfert de protéines de type western	25
2.5.4 Immunobuvardage	25
2.6 Fixation	26
2.6.1 Inclusion des cerveaux dans la paraffine pour obtenir des sections ...	26
2.6.2 Préparation des lames	26

2.7 TUNEL	26
2.8 Approche statistique	27

CHAPITRE III

RÉSULTATS	28
------------------------	----

3.1 L'acide kaïnique induit la surexpression de l'apoD endogène	28
3.2 Expression d'apoD transgène	32
3.3 L'acide kaïnique induit l'expression de la GFAP	33
3.4 L'acide kaïnique induit l'expression de COX-2	35
3.5 L'acide kaïnique induit l'apoptose dans le cerveau des souris	37
3.6 Comparer l'apoptose chez les transgéniques et les non-transgéniques	39
3.7 Études de comportement	41
3.7.1 Injection de 15mg d'acide kaïnique	42
3.8 Changement du poids	43

CHAPITRE IV

DISCUSSION	46
-------------------------	----

4.1 Modèle de neurodégénérescence	47
4.1.1 L'acide kaïnique induit la surexpression de l'apoD endogène	47
4.1.2 L'expression de l'apoD est corrélée avec l'expression de GFAP après le traitement à l'acide kaïnique	49
4.1.3 L'acide kaïnique induit l'expression de COX-2	50
4.1.4 L'acide kaïnique induit l'apoptose dans le cerveau des souris	51
4.2 La modulation d'apoptose par l'apoD chez les transgéniques	53
4.3 Réponses épileptiques et le changement de poids chez les transgéniques et les souris de type sauvage	54
4.4 L'expression d'apoD humaine reste intacte même après le traitement à l'acide kaïnique	54

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVE	56
--	-----------

ANNEXE

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES	60
--	-----------

6.1 Injection de 15mg d'acide kaïnique	60
--	----

6.2 Injection de 20mg d'acide kaïnique	61
--	----

BIBLIOGRAPHIE	63
----------------------------	-----------

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Structure tertiaire de l'apoD	3
1.2 Représentation schématique de la construction d'ADN utilisée pour la micro-injection dans des ovules fécondés de souris	13
1.3 Mécanismes expliquant les dommages cérébraux induits par l'excès du glutamate ou de l'acide kaïnique	17
3.1 Induction de l'expression d'apoD endogène dans l'hippocampe suite au traitement à l'acide kaïnique	29
3.2 Induction de l'expression d'apoD endogène dans le cortex suite au traitement à l'acide kaïnique	30
3.3 Induction de l'expression d'apoD endogène dans le cervelet suite au traitement à l'acide kaïnique	31
3.4 Expression de l'apoD endogène dans le reste du cerveau suite au traitement à l'acide kaïnique	33
3.5 Expression stable de l'apoD exogène (humaine, apoD H) suite au traitement à l'acide kaïnique	34
3.6 Induction de l'expression de GFAP dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet des souris de type sauvage (Wt) et les transgéniques (Tg) suite au traitement à l'acide kaïnique	35
3.7 Induction de l'expression de COX-2 suite au traitement à l'acide kaïnique	37
3.8 Apoptose (TUNEL) dans le cortex après le traitement à l'acide kaïnique	39
3.9 Apoptose (TUNEL) dans le cervelet après le traitement à l'acide kaïnique	40
3.10 Apoptose (TUNEL) dans l'hippocampe après le traitement à l'acide kaïnique ..	41
3.11 Comparaison de l'apoptose (TUNEL) dans le cerveau des transgéniques et les non-transgéniques	42
3.12 Graphique représentant le changement du poids	45

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
I Études de comportement (15mg KA)	44
II Supplémentaire- Études de comportement (15mg KA)	61
III Supplémentaire- Études de comportement (20mg KA)	62

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate
AMPc	Adénosine 3',5'-monophosphate cyclique
Apo	Apolipoprotéine
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BSA	Albumine de sérum bovin
Caspase	<i>CysteinyI-aspartate-cleaving proteases</i>
COX-1/2	Cyclooxygénase-1/2
CREBP	Protéine de liaison d'élément de réponse à AMPc
CTP	Cytosine triphosphate
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylènediaminotétraacétique, sel disodique
E-3M2H	Acide E-3méthyl-2 héxénoïque
ERK 1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase-1/2</i>
GAPDH	Glycéraldéhyde-phosphate-déshydrogénase
GCDFP	<i>Gross Cystic Disease Fluid Protein</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
GLaz	<i>Glial Lazarillo</i>
GTP	Guanosine triphosphate
HCOV	Coronavirus OC43 humain
HDL	Lipoprotéine de haute densité
HNE-4	4-hydroxynonenal
HnRNP	Ribonucléoprotéine nucléaire hétérogène
HO1/2	Hème-oxygénase 1/2
HRP	Horseradish peroxidase
IL	Interleukine
JNK	<i>C-Jun NH2-terminal protein kinase</i>
KA	Kaïnite (l'acide kaïnique)
KC-7	<i>Ketocholesterol-7</i>
kDa	Kilodalton
LCAT	Lécithine : cholestérol-acyl-transférase
LDL	Lipoprotéine de basse densité
MOPS	Acide 3-N-morpholino-propanesulfonique
NFkB	Facteur nucléaire kappa B
NFL	<i>Neurofilament light chain</i>
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NPC	Niemarm-Pick de type C
NSE	<i>Neuron specific enolase</i>
Oligo	Oligonucléotide
³² P	Isotope 32 du phosphate
PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PAGE	Électrophorèse sur gel de polyacrylamide
Pb	Paire de bases
PBS	Tampon phosphate salin
PCR	Réaction de polymérase en chaîne, amplification d'un segment d'ADN
PLA2	Phospholipase A2
RT-PCR	transcription inverse associée à une PCR, amplification d'un segment d'ARN
PVDF	Polyvinylidène difluoride
RAR	<i>Retinoic acid receptor</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SDS	Dodécyl sulfate de sodium
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SSC	Tampon salin citrate de sodium
Tg	Transgénique
TNF α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRAF1/2	<i>Tumor necrosis Receptor-Associated Factor</i>
TRIS	Tampon Tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling</i>
UV	Ultra-violet
VLDL	Lipoprotéine de très basse densité
Wt	<i>Wild-type</i>

LISTE DES SYMBOLES

Ci	Curie, unité de mesure d'activité d'une source radioactive
°C	Température en degrés Celsius
cpm	Compte par million
<i>g</i>	Force centrifuge
h	Heure
m	Milli, 10^{-3}
min	Minute
%	Pourcentage
rpm	Rotation par minute
sec	Seconde
U	Unités
V	Volt, unité de mesure de différence de potentiel
n	Nano, 10^{-9}
μ	Micro, 10^{-6}

RÉSUMÉ

De nombreuses pathologies du système nerveux sont associées à une augmentation de l'apolipoprotéine D (apoD), une lipocaline également exprimée au cours du développement normal et du vieillissement. Un gène homologue de l'apoD chez la drosophile a un rôle protecteur dans les situations de stress et son absence réduit la résistance au stress oxydatif et accélère la neurodégénérescence. Notre équipe a été la première à démontrer le rôle protecteur de l'apoD chez les vertébrés (souris) face à l'encéphalite induite par le coronavirus humain OC43 et aussi face au stress oxydatif induit par le paraquat. Afin de démontrer davantage l'effet bénéfique de l'apoD dans les situations pathologiques du système nerveux central, on a induit la neurodégénérescence en injectant l'acide kaïnique chez des souris transgéniques qui surexpriment l'apoD et des souris témoins non-transgéniques. L'acide kaïnique (analogue du glutamate) est un acide aminé excitateur dont l'activation des récepteurs dans le cerveau cause la dépolarisation des neurones et finalement la mort neuronale par apoptose (mimant la maladie d'Alzheimer). Ainsi ce modèle nous permettra de mesurer l'effet protecteur de l'apoD contre l'apoptose. Suite à l'injection intrapéritonéale, nous avons observé que l'acide kaïnique provoque des crises épileptiques chez les deux groupes de souris peu après l'injection; une légère différence concernant le taux et la gravité des convulsions entre les transgéniques et les non-transgéniques a été détectée. Cependant nous avons démontré par des analyses de type Northern, des immunobuvardages et par RT-PCR semi-quantitatif que l'acide kaïnique induit la surexpression de l'apoD endogène et provoque l'activation des cellules gliales (GFAP) dans l'hippocampe et le cervelet des souris au troisième jour après l'injection. Par contre, on a remarqué la présence de la cyclooxygénase-2 (inflammation) seulement dans l'hippocampe et le cortex de certaines souris (les souris ayant des très fortes convulsions) et son absence totale dans le cervelet. Nous avons aussi montré par la méthode TUNEL que l'acide kaïnique induit l'apoptose dans le cortex, le cervelet et surtout dans l'hippocampe, la zone la plus endommagée dans la maladie d'Alzheimer. Chez les souris transgéniques surexprimant l'apoD, dans les mêmes conditions, il y a moins d'apoptose comparativement aux souris de type sauvage, donc l'apoD pourrait jouer un rôle en modulant l'apoptose ainsi que protéger les neurones en prévenant l'apoptose. Les résultats obtenus au cours de différentes étapes de ce projet, tout d'abord mettent au point un modèle animal de neurodégénérescence associé à une surexpression de l'apoD et ensuite révèlent un autre aspect mal connu de rôle protecteur de l'apoD dans la régulation d'apoptose induite par l'acide kaïnique.

Mots-clés : Apolipoprotéine D, neurodégénérescence, acide kaïnique, transgénique, TUNEL Alzheimer, apoptose

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'apoD est une glycoprotéine appartenant à la famille des lipocalines dont le rôle principal est de transporter les petites molécules hydrophobes. Sa large expression chez les mammifères et ses nombreux ligands de différentes structures et fonctions font d'elle une protéine importante méritant d'être davantage étudiée. Une augmentation de l'expression d'apoD a été observée dans le système nerveux dans divers cas de neuropathologie comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la schizophrénie. L'apoD a le potentiel de transporter des stérols, des stéroïdes, de l'acide arachidonique et du cholestérol, molécules ayant un rôle dans la réparation du système nerveux, ainsi que d'éliminer des molécules toxiques telles que l'hème ou peut-être des lipides oxydés. Elle pourrait ainsi se lier à l'acide arachidonique et le cholestérol, les empêchant d'être oxydés en produits neurotoxiques. Cet ensemble d'informations nous amène à dire que l'apoD peut agir comme un facteur neuroprotecteur ou peut avoir un rôle dans la régénération ou la reinnervation des tissus nerveux. Pour mieux comprendre ce phénomène, nous avons choisi un modèle de neurodégénérescence induit par l'injection d'acide kaïnique. L'acide kaïnique, en causant les lésions dans différentes parties du cerveau, conduit à la mise au point d'un modèle neurodégénératif et épileptique mimant les maladies neurodégénératives. La comparaison entre les souris transgéniques surexprimant l'apoD et non-transgéniques de type sauvage exposées à l'acide kaïnique nous aidera à démontrer un rôle protecteur pour l'apoD et par extension, mieux comprendre le rôle de l'apoD dans les cas neuropathologiques.

1. ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 Le gène de l'apolipoprotéine D

Le gène de l'apoD humaine se retrouve sur le chromosome 3 au locus 3q26.2 alors que chez la souris il se situe sur le chromosome 16 (Drayna *et al.*, 1987; Warden *et al.*, 1992). Le gène d'apoD humaine possède 5 exons et s'étend sur 20 kpb. Son ADNc mesure 855pb.

(Drayna *et al.*, 1987). Le gène d'apoD chez la souris possède 6 exons et comprend 20 kpb et son ADNc mesure 800 pb (Warden *et al.*, 1992). L'analyse du promoteur humain de l'apoD a révélé la présence de plusieurs éléments potentiels de régulation. Parmi ceux-ci, on retrouve des éléments de réponse aux hormones stéroïdes, aux acides gras, au sérum et à la phase aiguë (Do Carmo *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 1993). La diversité de ces éléments de régulation reflète la complexité de la régulation de l'expression de l'apoD humaine.

1.2 La protéine apolipoprotéine D

Bien que l'apoD ait été caractérisée pour la première fois en 1970 par McConathy et Alaupovic (Mc Conathy *et* Alaupovic, 1973; Mc Conathy *et* Alaupovic, 1976), son rôle physiologique n'a pas encore été identifié. L'apoD humaine est un polypeptide mature de 169 acides aminés précédé par un peptide signal de 20 aa. D'après sa séquence, on peut prédire qu'elle aurait un poids moléculaire de 18kDa mais en pratique, en la migrant sur le gel de polyacrylamide et en présence de sodium dodécyl sulfate (SDS-PAGE), son poids varie entre 29 et 32 kDa. (Albers *et al.*, 1981; Drayna *et al.*, 1986 ; Yang *et al.*, 1994) ; cette différence serait due à la glycosylation sur les résidus d'asparagine aux positions 45 et 178 (Balbin *et al.*, 1990). La structure tertiaire de l'apoD (Fig. 1.1) est constituée de 8 feuillets β anti-parallèles qui se referment sur eux-mêmes pour former un baril- β dans lequel le ligand hydrophobe peut s'insérer (Peitch *et* Boguski, 1990 ; Boguski, 1992). A proximité de cette boucle hydrophobe, se retrouve une cystéine libre qui permet à l'apoD de former un lien avec d'autres protéines comme les apolipoprotéines A-I, A-II et B-100 (Camato *et al.*, 1975; Fielding *et* Fielding, 1980 ; Blanco-Vaca *et al.*, 1992), et aussi la lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT) (Fielding *et* Fielding, 1980). L'apolipoprotéine D a été retrouvée associée à des lipoprotéines de haute densité (HDL) et de très haute densité (VHDL) mais aussi de façon moindre avec les lipoprotéines de très basse densité (VLDL) dans le plasma humain et les autres espèces (Jarrier *et al.*, 1963 ; Rassart *et al.*, 2000). L'apoD humaine montre une homologie particulière avec la lipocaline BLC chez les bactéries gram négatives et Lazarrillo, la lipocaline au niveau des neurones et de la glie (NLAZ et GLAZ), chez la sauterelle et la drosophile. En plus, ces protéines sont les seules lipocalines liées à la membrane (Bishop, 2000). L'expression de ces lipocalines semble être associée avec un stress membranaire ou un remodelage des membranes qui suggère un rôle dans la genèse ou

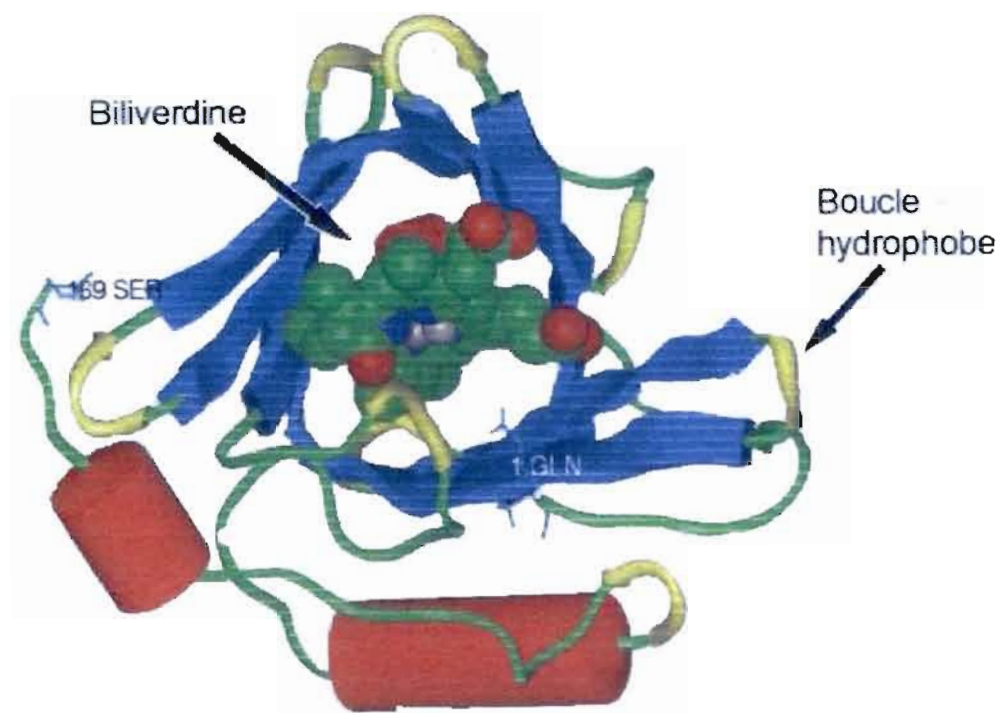


Figure 1.1- Structure tertiaire de l'apoD. La protéine est constituée de 8 feuillets- β antiparallèles (en bleu) qui forme ensemble le baril- β dans lequel s'introduit le ligand hydrophobe (la biliverdine sur la figure) et d'une courte région d'hélice - α (en rouge) en c-terminal.

la réparation des membranes. (Bishop 2000; Sanchez *et al.*, 2000)

1.3 Expression tissulaire et cellulaire de l'apoD

Contrairement aux autres apolipoprotéines dont l'expression est retrouvée majoritairement au foie et à l'intestin, l'apoD s'exprime dans divers tissus chez les vertébrés (Drayna *et al.*, 1986; Provost *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990; Boyles *et al.*, 1991; Séguin *et al.*, 1995; Sanchez *et al.*, 2002). Chez l'humain, l'apoD est exprimée surtout dans les glandes surrénales, le pancréas, les reins, le placenta, la rate, les poumons, et les systèmes nerveux central (SNC) et périphérique (SNP) (Drayna *et al.*, 1986; Rassart *et al.*, 2000). Dans le SNC l'apoD est synthétisée surtout dans les cellules gliales de la matière blanche : les astrocytes,

les oligodendrocytes et certains neurones. Dans le SNP, elle est exprimée par les fibroblastes (Boyles *et al.*, 1990; Provost *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 1998). Chez la souris contrairement à l'humain, l'apoD n'est fortement exprimée que dans le SNC et les tissus adipeux et à de faibles niveaux dans les testicules, les glandes mammaires et salivaires, le muscle squelettique, le thymus et les poumons et presque indétectable dans les reins, le cœur, le foie et la rate (Séguin *et al.*, 1995, Yoshida *et al.*, 1996). Chez le rat la distribution tissulaire est semblable à celle de la souris (Boyles *et al.*, 1991). Chez le singe l'ARNm de l'apoD se retrouve dans la majorité des organes et dans les fibroblastes qui sont à proximité des vaisseaux sanguins et les cellules gliales dans la matière blanche du SNC. (Smith *et al.*, 1990). Chez le lapin, l'expression de l'apoD est semblable à celle de l'humain et est retrouvée dans les poumons, les glandes surrénales, le SNC, la rate, les reins, le tissu adipeux et les ovaires et moins dans le foie, l'intestin, la moelle épinière, le thymus, les muscles et le système lymphatique (Provost *et al.*, 1990). Chez le cochon la distribution tissulaire est semblable à celle de l'humain et du lapin (Provost *et al.*, 1995). Chez le poulet, l'apoD aviaire a été observée dans l'ovocyte. Il a été postulé que l'apoD pourrait jouer un rôle dans le transport des lipides du plasma à l'ovocyte (Vieira *et al.*, 1995).

1.4 Apolipoprotéine D et ses ligands

Aucun ligand physiologique de l'apoD n'a encore été trouvé, mais les études ont montré que l'apoD a une grande affinité pour diverses molécules hydrophobes. La diversité de ses ligands potentiels et de ses sites d'expression suggère que l'apoD soit une protéine multi ligands-multi fonctions (Rassart *et al.*, 2000).

1.4.1 Le Cholestérol

Bien que le cholestérol ne soit pas le ligand présentant la plus grande affinité pour l'apoD, sa très grande disponibilité en fait malgré tout un ligand important (Peitch *et Boguski*, 1990; Patel *et al.*, 1997). L'apoD peut transporter le cholestérol depuis les organes périphériques vers le foie, là où son estérification par la LCAT (Lécithine Cholestérol Acyle Transférase) va être contrôlée (Spreyer *et al.*, 1990). Selon Steyrer et Kostner (Steyrer *et Kostner*, 1998), l'apoD a un effet stabilisateur de la réaction de la LCAT. L'apoD peut aussi s'associer avec la LCAT qui catalyse l'estérification du cholestérol, une étape clé pour le

transport inverse du cholestérol. Il est intéressant de remarquer que le cholestérol est un facteur de risque dans la maladie d'Alzheimer. De plus le taux de HDL (Lipoprotéine de haute densité) dans le plasma et l'activité de la LCAT, chez les patients Alzheimer sont réduits. Les médicaments anti-cholestérol peuvent peut-être fonctionner comme un traitement efficace (Puglielli *et al.*, 2003).

1.4.2 Les hormones stéroïdes

L'apoD (GCDFP-24 : Gross Cystic Disease Fluid Protein) a été caractérisée pour la première fois dans le fluide kystique mammaire avec une grande capacité de se lier à la progestérone et à la prégnénolone (Pearlman *et al.*, 1973). Les hormones stéroïdes jouent un rôle très important dans les organes tels que les glandes mammaires et la prostate. Elles ont aussi un rôle important dans le système nerveux. Par exemple la prégnénolone est impliquée dans la mémoire (Flood *et al.*, 1992; Vallee *et al.*, 1997) et la progestérone pourrait stimuler la croissance axonale et la myélinisation dans les nerfs périphériques sectionnés (Koenig *et al.*, 2000). Dans les différentes lignées cellulaires tumorales, l'expression d'apoD peut directement ou indirectement être modulée par les hormones stéroïdes.

1.4.3 La bilirubine

La bilirubine est produite par dégradation de l'hémoglobine et elle est retirée de la circulation par le foie. L'albumine sérique est son transporteur naturel. Alors que l'apoD peut faciliter ce transport dans la circulation dans les situations où la concentration de bilirubine est plus élevée que le taux normal ou dans certaines maladies génétiques comme Analbuminemia (déficience en albumine) (Goessling *et al.*, 2000). En fait chez l'humain, le singe et le lapin, une concentration très importante d'ARNm de l'apoD a été trouvée dans la rate, le site principal de destruction des globules rouges. (Provost *et al.*, 1991). Dans certaines conditions de stress (UV, les sels de métaux lourds et les agents oxydants), la bilirubine peut être produite dans les tissus par l'enzyme hème oxygénase (exprimée par deux gènes HO1 et HO2) induite par le stress (Keyse *et al.*, 1989). L'apoD interviendrait pour retirer la bilirubine produite avant qu'elle n'atteigne des concentrations toxiques.

1.4.4 L'acide E-3-Méthyl-2 hénexoïque

L'acide E-3méthyl-2 hénexoïque (E-3M2H) est la substance odoriférante dans les sécrétions des glandes apocrines. Cette substance est transportée à la surface de la peau par deux protéines dont l'une est identifiée comme l'apoD (Zeng *et al.*, 1996). Donc l'apoD pourrait jouer aussi un rôle dans la communication phéromonale.

1.4.5 L'acide arachidonique

L'acide arachidonique a été reconnu comme le meilleur ligand pour l'apoD (ratio 1 :1). Il est aussi un précurseur des eicosanoïdes et des prostaglandines (Von Euler, 1988) et son métabolisme est directement relié à la formation de l'AMP cyclique (Lagrande *et Curtis-Prior*, 1998). L'apoD peut être impliquée dans le transport de l'acide arachidonique dans le but de synthétiser des eicosanoïdes et les prostaglandines et donc elle pourrait jouer un rôle important dans la régulation cellulaire. Elle peut aussi contrôler le métabolisme de l'acide arachidonique via la LCAT. Dans la maladie d'Alzheimer et d'autres neuropathologies, la Phospholipase A2 (PLA2) est fortement augmentée dans le SNC (Bazan *et al.*, 2002). L'activité de PLA2 et le relâchement d'acide arachidonique pourraient générer des espèces réactives à l'oxygène (ROS), des lysophospholipides, des acides gras libres, des facteurs activateurs de plaquettes et des eicosanoïdes hautement réactifs qui participeraient tous dans les dommages cellulaires lors de la neurodégénérescence. Thomas et ses collaborateurs ont montré que l'ajout d'apoD exogène directement dans le milieu de culture, favorisent de façon spécifique l'incorporation d'acide arachidonique dans les membranes cellulaires (Thomas *et al.*, 2003), ce qui contribue à la stabilisation des membranes.

1.5 Les facteurs régulant l'expression d'apoD

Des études en culture cellulaire ont montré que l'expression de l'ARNm de l'apoD est augmentée lorsque les cellules sont en arrêt de croissance induit par la confluence ou la privation de sérum (Provost *et al.*, 1991; Do Carmo *et al.*, 2002). Plusieurs hormones et cytokines peuvent soit augmenter (androgène, glucocorticoïde, interleukine-1 α , acide rétinolique) soit diminuer (œstrogène, interleukin-6) l'expression d'apoD (Simard *et al.*, 1990; Simard *et al.*, 1991; Simard *et al.*, 1992; Lopez *et al.*, 1994; Blais *et al.*, 1995). Sauf l'interleukine-6 qui inhibe à la fois l'apoD et la croissance cellulaire, tous les autres agents

cités ci-dessus, augmentent l'expression d'apoD mais inhibent la croissance cellulaire, tandis que l'œstrogène, qui fait diminuer l'expression d'apoD, stimule la prolifération cellulaire.

1.6 L'apoD et le métabolisme

Les études ont montré qu'il existe une corrélation positive entre le niveau d'ARNm de l'apoD dans l'hypothalamus, la masse de gras corporel et les leptines (Liu *et al.*, 2001). Dans l'hypothalamus, la leptine et la forme longue de son récepteur, ob-Rb, jouent un rôle clé dans la régulation de l'apport de nourriture et du poids corporel (Liu *et al.*, 2001). Cependant l'apoD n'interagit qu'avec la portion cytoplasmique de l'ob-Rb, une forme mutante tronquée du récepteur qui cause l'obésité. La modulation d'apoD a été aussi trouvée dans les pathologies comme la maladie de Tangier, la déficience familiale en LCAT, le diabète de type 2, l'alcoolisme, le syndrome X et le dysfonctionnement rénal (Alaupovic *et al.*, 1981; Albers *et al.*, 1985; Dieplinger *et al.*, 1986; James *et al.*, 1986; Baker *et al.*, 1994; Vijayaghavan *et al.*, 1994; Lewohl *et al.*, 2000; Saito *et al.*, 2002; Gottsch *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 2004). L'association de l'apoD avec ces maladies peut être liée à son rôle dans le métabolisme des lipides. À cause de sa capacité à lier l'acide arachidonique, l'apoD contribuerait aussi au métabolisme des phospholipides membranaires en stabilisant le niveau d'acide arachidonique dans les membranes cellulaires (Thomas *et al.*, 2003d; Yao *et al.*, 2005). Conformément à ceci, le cerveau de souris déficientes en apoD (apoD-KO) présente une composition en gras différente. Ainsi, leur cerveau a un plus petit ratio du cholestérol envers phospholipides totaux, mais une plus grande concentration d'acide docosahexaénoïque, d'acide linoléïque et de certains acides gras saturés comparativement aux souris de type sauvage (Thomas *et al.*, 2007). L'implication dans la redistribution de lipides après des lésions nerveuses périphériques a également été suggérée (Boyles *et al.*, 1990a). Une étude récente de notre équipe suggère l'importance de l'apoD dans le métabolisme des lipides et du glucose. En effet les souris surexprimant l'apoD deviennent insuline-résistantes et développent une stéatose hépatique (Do Carmo *et al.*, 2009).

1.7 L'apoD et la myélinisation

Ong et ses collaborateurs (Ong *et al.*, 1999) ont montré que l'expression de l'apoD augmentait dans le cerveau des rongeurs entre 10 et 20 jours après la naissance, coïncidant

avec la période de myélinisation active. Boyles et ses collègues (Boyles *et al.*, 1990) ont identifié 2 apolipoprotéines : l'apoD et l'apoA-IV, qui sont accumulées lors de la régénération des nerfs périphériques. C'est ainsi que l'apoD peut être utile en transportant le cholestérol vers les macrophages pour le stocker afin d'être réutilisée lors de la myélinisation. Il est envisageable que l'apoD puisse jouer un rôle pour apporter les stérols, l'acide arachidonique ou d'autres lipides nécessaires à la synthèse de myéline lors de la régénération ou durant le développement du cerveau.

1.8 L'apoD dans le développement

L'apoD est également impliquée dans la gestation et le développement du fœtus (Provost *et al.*, 1995). Dans le cerveau d'embryon de rat, l'ARNm de l'apoD commence à être exprimé après 12 jours de développement. Cette expression se poursuit et augmente de 10 à 20 jours après la naissance (Ong *et al.*, 1999). Chez la souris, l'apoD est sélectivement modulée du jour E9 à la naissance dans le mésenchyme et le neuroépithélium (Sanchez *et al.*, 2002). L'apoD est également présente dans le vitellus de l'ovocyte en croissance rapide. D'abord associée au transport et la mobilisation des lipides durant l'embryogenèse chez les espèces ovipares (Vieira *et al.*, 1995), il est plus probable qu'elle transporte des molécules régulatrices telles que la vitamine A et les hormones thyroïdes (Yao et Vieira 2002).

1.9 L'apoD et le stress oxydatif

Les ROS ou les radicaux libres, peuvent causer des dommages aux lipides, aux protéines et à l'ADN. Les membranes neuronales y sont extrêmement sensibles. Le stress oxydatif pourrait être la cause, ou du moins interviendrait dans le processus pathologique de plusieurs neuropathologies. Une augmentation du métabolisme oxydatif est observée dans le cerveau avec le vieillissement et dans plusieurs désordres neurologiques tels que l'Alzheimer, les maladies cérébrovasculaires, la maladie des neurones-moteurs et la schizophrénie, (Dewan *et al.*, 2001; Floyed *et al.*, 2002) toutes les conditions où il y a aussi une augmentation d'apoD. Le paraquat génère un stress oxydatif par la production des radicaux libres. Ceci diminue la quantité de NADPH (Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate) menant ainsi à la peroxydation des lipides et à la destruction cellulaire. Il augmente aussi l'expression d'apoD chez les souris traitées (Bajo-Graneras *et al.*, 2006). Il a été également suggéré qu'en

bloquant le JNK (*c-Jun NH2-terminal protein kinase*), l'expression d'apoD induite par le paraquat serait inhibée. Ceci indique que l'apoD est régulée par cette voie apoptique (Bajo-Graneras *et al.*, 2006). Des données obtenues dans de récentes études corroborent l'hypothèse d'un effet neuroprotecteur de l'apoD face au paraquat. En effet, des souris transgéniques, surexprimant l'apoD dans le cerveau, présentent un meilleur taux de survie et moins de sensibilité face à un stress oxydatif induit dans le cerveau par l'injection du paraquat (générateur de radicaux oxygénés libres ou ROS). A l'inverse, chez les souris déficientes de l'apoD (apoD^{-/-}), une augmentation de la sensibilité face au stress oxydatif ainsi qu'une déficience de certaines tâches cognitives ont été notées après l'injection du paraquat (Ganfornina *et al.*, 2008). Cet effet neuroprotecteur de l'apoD, observé à la suite d'un stress oxydatif, a également été obtenu après induction d'un stress inflammatoire (Do Carmo *et al.*, 2008). En effet, les résultats de cette étude indiquent que l'injection intracérébrale d'un virus OC43, induisant une inflammation dans le cerveau, entraînait une activation accrue des processus inflammatoires et des cellules gliales, ainsi qu'un important taux de mortalité chez des souris de type sauvage. Toutefois, la surexpression d'apoD chez les souris transgéniques résulte en une augmentation significative du taux de survie de ces souris ainsi qu'une atténuation de certains processus inflammatoires (tels que l'infiltration des cellules immunitaires) face à l'infection induite par OC43. De plus, cette protection semble être corrélée avec une restriction de l'activité de la PLA2 (phospholipase A2). Ceci suggère que l'apoD protège de l'encéphalopathie induite par OC43, via la voie de signalisation des PLA2. Une étude a récemment démontré que l'expression de l'apoD humaine est faible chez les nouveau-nés, alors que son expression monte au cours de la vie de 6 à 8 fois chez l'adulte, contrairement à l'apolipoprotéine E (apoE), les récepteurs des lipoprotéines de faible densité (LRP8) et le 3-hydroxy-3-méthyle-glutaryl-CoA réductase (HMGCR) (enzyme qui joue un rôle régulateur dans la synthèse du cholestérol et du dolichol ainsi que dans le développement du cerveau) qui sont plus exprimés au début de la vie. Cette étude révèle en plus que l'expression de l'apoD est augmentée tout au long de la vie humaine dans le cortex préfrontal, ce qui est en corrélation avec des marqueurs génétiques et biochimiques du stress oxydatif (Kim *et al.*, 2009).

Une étude (Do Carmo *et al.*, 2007) a montré que le H₂O₂, le Rose Bengal et les UV induisent l'expression d'apoD dans la culture cellulaire. Cette étude a établi également une

relation entre l'expression d'apoD et l'inflammation. L'apoD peut protéger les neurones dans la situation de stress en piégeant les médiateurs inflammatoires et surtout en capturant l'acide arachidonique libéré de la membrane cellulaire, après l'inflammation. L'acide kaïnique augmente également les ROS, une autre voie pour induire l'expression d'apoD. L'homologue de l'apoD chez la drosophile GLaz (Glial Lazarillo) a été démontré comme augmentant la résistance au stress. Son absence réduit la résistance au stress oxydatif et au manque de nourriture et diminue la durée de vie. Elle provoque aussi une réduction des lipides ce qui cause une diminution de la masse corporelle et affecte le comportement. Ces effets ont été corrélés avec une augmentation de la mort neuronale et de la quantité de lipides peroxydés (Sanchez *et al.*, 2006). L'effet inverse a été observé chez la drosophile surexprimant GLaz ou l'apoD humaine avec une augmentation de la résistance au stress oxydatif et de la longévité (Muffat *et al.*, 2008; Walker *et al.*, 2006). L'homologue de l'apoD chez la plante, AtTIL, démontre un rôle semblable (Charron *et al.*, 2008).

1.10 L'apoD et le cancer

L'apoD est surexprimée dans certains cancers comme : les cancers du sein, de l'ovaire, de l'endomètre, de la peau et du système nerveux central. (Balbin *et al.*, 1990; Aspinal *et al.*, 1995; Terrisse *et al.*, 1998; Vazquez *et al.*, 2000; Rojo *et al.*, 2001; Hunter *et al.*, 2002). Elle est moins exprimée dans l'oncocytoomas thyroïde (Baris *et al.*, 2004) et elle a aussi été identifiée comme un suppresseur de la tumeur. Ainsi, dans les carcinomes des cellules squameuses de l'œsophage, le gène de l'apoD est inactivé par méthylation et a été identifié comme un candidat de la suppression tumorale. L'ajout d'apoD à des cellules en culture a aussi démontré sa puissante activité suppresseur de croissance (Yamashita *et al.*, 2002). Le rôle suppresseur de tumeur de l'apoD a également été démontré dans le cancer du sein. Ce rôle provient de la capacité de l'apoD à interagir avec et à inhiber l'ostéopontine, un gène important dans la formation de tumeurs et de métastases (Jin *et al.*, 2006). Bien que la corrélation entre le niveau tumoral et l'expression d'apoD reste ambiguë, cette association dépendamment des types de tumeur peut être positive ou négative et la cause ou la correspondance entre cette transformation cellulaire et l'expression d'apoD reste obscure. Hunter et ses collègues (Hunter *et al.*, 2002) ont identifié l'apoD comme un marqueur potentiel et utile dans les tumeurs cérébrales primaires tel que les astrocytomes pilocytiques,

les gangliogliomes, les SEGAs (Astrocytomes giganto-cellulaires subépendymaires) et PXAs (*Pleomorphic xanthoastrocytomas*). Pourtant, Lisovsky et ses collaborateurs (Lisovsky *et al.*, 2007), dans une étude récente, ont montré que l'expression d'apoD n'est pas spécifique dans le dermatofibrosarcome protubérant et que l'apoD n'a pas d'utilité réelle dans le pronostic de cette tumeur. La présence de l'apoD dans ces tumeurs peut servir comme un bon indicateur pronostique mais peut être tout simplement un reflet d'arrêt de croissance, dû à la différenciation cellulaire. Il a été démontré que l'induction d'apoD est modulée par les récepteurs nucléaires à l'acide rétinoïque (RAR) menant à une inhibition significative de la prolifération cellulaire. Ainsi, l'apoD pourrait être un marqueur biochimique de différenciation et d'arrêt de prolifération via RAR dans les cellules de cancer (Lopez-Boado *et al.*, 1996).

1.11 L'apoD dans les neuropathologies

Un taux élevé d'apoD a été trouvé dans le liquide céphalorachidien des patients atteints de méningo-encéphalite, d'une maladie des neurones moteurs, des maladies cérébrovasculaires, de la sclérose en plaque, des maladies à prion et de l'Alzheimer; (Terrisse *et al.*, 1998; Dandoy *et al.*, 1998; Reindl *et al.*, 2001), ainsi que dans le cerveau des patients atteints de schizophrénie et de trouble bipolaire (maniac-dépression) (Thomas *et al.*, 2001). Plus récemment, l'apoD a été trouvée augmentée dans le cerveau de patients atteints de la maladie de Parkinson et cette augmentation a été associée à une augmentation de la production d'apoD par les cellules gliales (Ordofiez *et al.*, 2006). Elle augmente également dans le cortex préfrontal de gens atteints d'alcoolisme ou de tabagisme chroniques (Flatscher-Bader et Wilce 2006). Les maladies neurodégénératives sont accompagnées d'une variété de réponses inflammatoires. D'une part une inflammation aiguë protégerait les neurones et aiderait à la régénération après un stress, mais d'autre part, il semble qu'une inflammation soutenue de façon chronique pourrait contribuer au processus neurodégénératif. L'apoD peut intervenir dans la régulation de l'inflammation via le contrôle de transport de l'acide arachidonique pour la synthèse des prostaglandines et des leukotriènes. De plus certaines hormones et cytokines impliquées dans la régulation de l'inflammation comme l'interleukine-1, l'interleukine b et les glucocorticoïdes peuvent moduler l'expression d'apoD (Blais *et al.*, 1994; Blais *et al.*, 1995). Ainsi, une augmentation de l'expression de l'apoD a

été observée dans le cortex cérébral de personnes âgées. Cette augmentation est probablement due à une hausse du nombre d'astrocytes réactifs (Kalman *et al.*, 2000; del Valle E *et al.*, 2003). La quantité de l'apoD est significativement supérieure ($P < 0.005$) dans l'hippocampe des patients atteints de la maladie d'Alzheimer par rapport aux sujets sains. Dans le liquide céphalorachidien, elle est de 3 à 4 fois supérieure chez les patients avec la maladie d'Alzheimer, mais elle était également élevée chez les patients ayant d'autres pathologies neurologiques (Terrisse *et al.*, 1998). Cette augmentation semble être liée au caractère commun de la maladie Alzheimer et des autres pathologies neurologiques et inflammatoires, probablement en réaction aux dommages subis par les neurones (Terrisse *et al.*, 1998). En effet, dans le cerveau de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, il existe deux types de lésions, qui sont bien caractérisées (Terry, 1994) : les dégénérescences neurofibrillaires (NFT) qui sont constituées de la protéine Tau et les plaques séniles constituées de la protéine dite β -amyloïde. Une récente étude a montré que l'apoD est présente dans les plaques séniles mais qu'elle est localisée préférentiellement autour ou près des dépôts amyloïdes, alors que l'apoE est toujours localisée au cœur des plaques amyloïdes (Navarro *et al.* 1998). Desai et ses collaborateurs ont trouvé un lien entre une variation dans la séquence de gène de l'apoD dans la population noire africaine et un risque plus élevé de développer la maladie d'Alzheimer (Desai *et al.*, 2003).

On observe aussi une augmentation d'apoD lorsque des lésions sont causées physiquement ou chimiquement au SNC de rongeur chez les modèles tels qu'une lésion du cortex enthorhinal (ECL), l'accident traumatique au cerveau ou l'injection d'une excitotoxine comme l'acide kaïnique (Ong *et al.*, 1997; Terrisse *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 1999). Le modèle animal de la maladie de Niemann-Pick est une dysfonction génétique qui affecte l'homéostasie et qui augmente l'expression de l'apoD. L'animal modèle de Niemann-Pick type C montre une anomalie dans le métabolisme du cholestérol et également une augmentation de l'expression d'apoD dans le plasma, le cerveau, les tissus adipeux, le cœur, le thymus et dans les astrocytes mis en culture cellulaire (Suresh *et al.*, 1998 ; Yoshida *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent donc un possible rôle de l'apoD dans la réponse cellulaire face à la progression de ces maladies, en agissant comme un facteur protecteur des neurones en situation de stress.

1.12 Les souris transgéniques

Les souris transgéniques qui surexpriment l'apoD humaine dans le système nerveux ont été produites en utilisant l'ADNc de l'apoD humaine mis sous le contrôle de promoteur spécifique au système nerveux soit celui du gène Thy-1 humain. La portion du gène utilisé comprend : le promoteur, le premier exon, le premier intron et la partie non- codante du deuxième exon (fig. 1.2). Le premier intron contient un important activateur de transcription neuronale. Ce fragment de gène est suffisant pour induire une très forte expression dans les neurones de toutes les régions du cerveau et à un niveau un peu plus faible dans la matière blanche du cerveau et du cervelet (Gordon *et al.*, 1987). Les transgènes ont été microinjectés dans le pronoyau d'ovules fécondés de souris, puis les ovules furent réimplantés dans des femelles pseudo gestantes. Les souriceaux qui ont intégré les transgènes dans leurs génomes, furent accouplées afin d'établir des lignées. Des lignées qui expriment bien l'apoD humaine dans le cerveau furent conservées pour des expériences futures.

Aucune différence phénotypique n'a été observée chez les transgéniques par rapport à leur type sauvage. Selon l'étude de comportement faite par notre équip, les transgéniques se montrent plus actives, bougent plus verticalement et sont plus curieuses. Par contre, dans la capacité visuelle, la sensibilité à la douleur, la démarche et la force musculaire, aucune différence significative par rapport à leur type sauvage n'a été détectée (Do Carmo *et al.*, 2008).

Thy-1/apoD

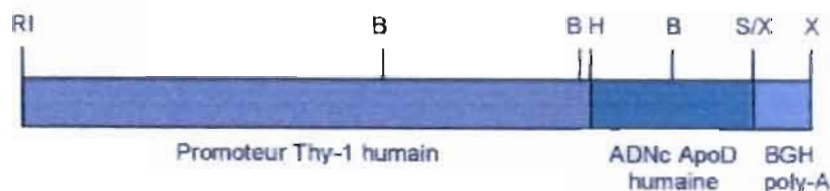


Figure 1.2- Représentation schématique de la construction d'ADN utilisée pour la micro-injection dans des ovules fécondés de souris.

1.13 L'acide kaïnique

1.13.1 Le glutamate

L'acide kaïnique a été initialement extrait de l'algue *Digenea simplex*. C'est un analogue du glutamate qui est maintenant reconnu comme le principal neurotransmetteur excitateur dans le SNC. Le glutamate joue un rôle dans l'apprentissage et la mémorisation, mais sa présence en grande quantité peut entraîner des effets pathologiques par un processus d'excitotoxicité tel que constaté dans la maladie d'Alzheimer. Le glutamate ne peut pas traverser la barrière hémato-encéphalique, au stade adulte. Par conséquent, les niveaux de glutamate présents dans le cerveau sont dus à sa synthèse locale (Hertz *et al.* 1999). En effet, les astrocytes récapturent le glutamate libéré par les neurones et le transforment en glutamine. Celle-ci est ensuite transportée depuis les cellules gliales jusqu'aux terminaisons synaptiques où elle est convertie en glutamate. Il existe deux groupes de récepteur pour le glutamate: les récepteurs ionotropiques tels que : les récepteurs du N-méthyl-D-aspartate (NMDA), du kaïnate (KA) et de l' α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) (Watkins 1981) et les récepteurs métabotropes étant des récepteurs couplés aux protéines G hétérotrimériques (Sladeczek 1987). Des études montrent que dans la maladie d'Alzheimer une excitotoxicité glutamatergique est médiée par les récepteurs du NMDA (Sonkusare *et al.*, 2005; Koutsilieri et Riederer 2007). Il faut noter qu'une des meilleures solutions thérapeutiques actuellement disponible pour la maladie d'Alzheimer reste l'utilisation de la Mémantine, un antagoniste du récepteur NMDA (Scarpini *et al.*, 2003).

1.13.2 L'acide kaïnique et son activité excitatrice

La neurotoxicité de l'acide kaïnique a été découverte pour la première fois par Olney et ses collaborateurs en étudiant la neurotoxicité du glutamate sur les neurones de l'hypothalamus et de la rétine (Olney *et al.*, 1974). L'utilisation de l'acide kaïnique pour produire une destruction des perikaryas et des dendrites dans le site de l'injection local dans le cerveau est devenue populaire grâce aux travaux de Coyle et Schwarcz (Coyle et Schwarcz, 1976). L'inspection macroscopique des cerveaux obtenus à partir des animaux sacrifiés peu après l'injection de l'acide kaïnique (90 minutes) révèle une augmentation de volume dans les hémisphères cérébraux, surtout dans le lobe temporal qui semble enflé et montre des lésions. Les autres parties de cerveaux (le cortex frontal, le cervelet, le tronc

cérébral...) restent macroscopiquement normales mais du point de vue histopathologique montrent des changements (Olney *et al.*, 1974; Ben-Ari *et al.*, 1980a; Ben-Ari *et al.*, 1980b; Schwob *et al.*, 1980). Dans certaines régions telles que le cortex olfactif et l'amygdale, les réactions neuropathologiques semblent plus sévères après 24-36 heures. La dégradation de l'amygdale semble être progressive et peut être liée aux changements du comportement, y compris l'agressivité (Cavalheiro *et al.*, 1983; Sperk *et al.*, 1983; Baran *et al.*, 1988). La dégradation neuronale a été abondamment observée dans l'hippocampe. Les neurones les plus vulnérables sont les cellules pyramidales de CA3. Dans certains cas, des animaux ont montré des dommages modérés ou sévères au niveau des cellules pyramidales dans la zone CA1. (Ben-Ari *et al.*, 1985; Tanaka *et al.*, 1988). L'acide kaïnique passe très faiblement à travers la barrière hémato-encéphalique mais le faible pourcentage de la dose injectée qui peut arriver aux récepteurs dans le cerveau suffit à induire la dégénérescence (Tauck *et Nadler*, 1985; Berger *et al.*, 1986). La neurotoxicité du glutamate ainsi que celle de l'acide kaïnique sont dépendante du calcium. L'influx de Ca^{++} joue un rôle important dans la propagation et la maintenance de l'activité épileptique. L'hypothèse de l'excitotoxicité suggère que l'activation excessive des neurones est un événement pathologique initial dans la perte cellulaire. La dépolarisation prolongée des membranes neuronales augmente dramatiquement la perméabilité des récepteurs de glutamate et de kaïnate au Ca^{++} .

Plusieurs mécanismes expliquant les dommages cérébraux induits par l'acide kaïnique ou autrement dit l'excès du glutamate ont été proposés tels que montré sur le schéma ci-dessous (fig 1.3). Lorsque le glutamate est présent dans le milieu extracellulaire à des concentrations anormalement élevées, les canaux ioniques couplés aux sites de liaison spécifiques de ce neurotransmetteur s'ouvrent via la stimulation des récepteurs de glutamate, produisant une élévation persistante de la concentration intracellulaire de Na^+ et la dépolarisation de la cellule. L'augmentation de la concentration intracellulaire de Na^+ provoque aussi l'entrée d'ions de Ca^{++} via les canaux calciques ou une mobilisation du Ca^{++} stocké dans les réticulums endoplasmiques par les récepteurs métabotropes du glutamate. Cette concentration excessive du calcium intracellulaire a des conséquences néfastes :

- La concentration élevée du calcium intracellulaire cause l'hyperexcitabilité nerveuse et la convulsion. La convulsion associe une hypertension artérielle aigüe qui peut induire un œdème cérébral focal avec l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-

encéphalique et entraîner à son tour la dégradation neuronale. Cela conduit à la sur-activation des cellules gliales dont la surexpression de GFAP qui est entre autres souvent utilisée comme un marqueur indirect de la neurodégénérescence (Zhang *et al.*, 1998; Kaasinen *et al.*, 2000; Zemlan *et al.*, 2003).

- L'élévation des concentrations intracellulaires en calcium perturbe gravement l'activité mitochondriale et le fonctionnement de la chaîne de phosphorylation oxydative, ce qui conduit progressivement à un arrêt de la production d'ATP, fatal pour la cellule. L'augmentation du Ca^{++} entraîne aussi la production des enzymes telles que la calpaïne et les phospholipases C qui endommagent les mitochondries de type PMT et cause l'ouverture des pores de transition de perméabilité mitochondriale. Cela conduit à la libération des molécules apoptogènes telles que les caspases et aboutit finalement à l'apoptose et à la mort cellulaire.

Il a été remarqué que l'activation des récepteurs extrasynaptiques au NMDA, déclenchée par l'exposition au glutamate ou par des conditions d'ischémie ou d'hypoxie, inactive le facteur transcriptionnel CREBP (Cyclic adenosine monophosphate response element binding protein) qui à son tour provoque la suppression du potentiel de membrane de la mitochondrie et l'apoptose (Hardingham *et Bading*, 2002).

- Enfin l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium stimule en série différentes enzymes participant activement à la destruction de la cellule notamment la phospholipase A2 qui active également la cyclooxygénase-2 (COX-2). La COX-2 est l'enzyme responsable de la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique, ce qui entraîne différentes réponses inflammatoires.

1.13.3 L'acide kaïnique et l'apoD

Les dommages induits par l'acide kaïnique sont suivis par les réponses inflammatoires, l'expression de cytokines, la formation de radicaux libres (ROS) et le stress oxydatif dans l'hippocampe, ce qui a été supposé comme étant le déclencheur de l'expression d'apoD dans le but de protéger les cellules (Ravizza *et al.*, 2005; Penkowa *et al.*, 2005). Une augmentation remarquable de l'expression d'apoD a été détectée dans les neurones de l'hippocampe de rat injecté avec de l'acide kaïnique. Cette augmentation apparaît aussi tôt que le premier jour après l'injection de l'acide kaïnique et elle a été détectée dans les dendrites, le corps cellulaire

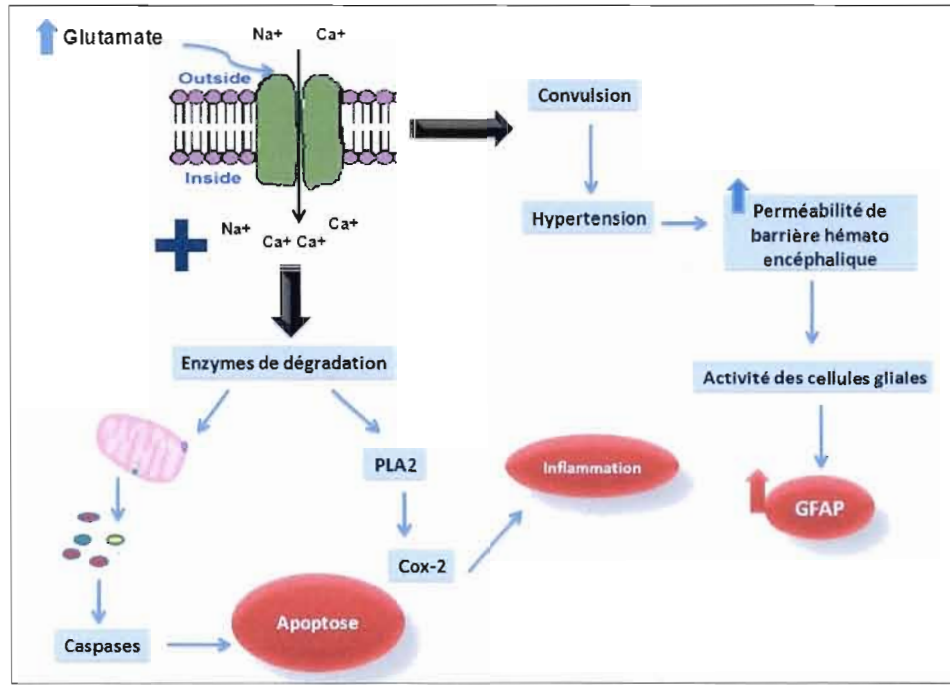


Figure 1.3 Mécanismes expliquant les dommages cérébraux induits par l'acide kaïnique. La stimulation excessive des récepteurs de glutamate cause une entrée massive du Na⁺ et Ca²⁺ dans la cellule et finalement la dépolarisation de la cellule. Cette concentration excessive du calcium intracellulaire cause : 1- La convulsion associant une hypertension qui augmente la perméabilité de la barrière hémato encéphalique conduisant à la sur-activation des cellules gliales dont la surexpression de GFAP. 2- L'activation des enzymes de dégradation qui endommagent les mitochondries conduisant à la libération des molécules apoptogènes telles que les caspases et qui aboutit finalement à l'apoptose. 3- Les enzymes de dégradation induisent aussi la phospholipase A2 activant à son tour le COX-2 qui se traduit par une inflammation.

des neurones et très peu dans les axones terminaux. Aucune augmentation de l'apoD n'a été observée dans la matière blanche. Très peu d'apoD a également été observée dans les vaisseaux sanguins, suggérant que l'apoD ait été synthétisée par les neurones et n'a pas été transportée par la circulation sanguine aux neurones (Montpied *et al.*, 1999). Montpied et ses collègues (Montpied *et al.*, 1999) ont étudié l'expression d'apoD et E une semaine après l'injection intra-amygdale de l'acide kaïnique chez le rat et aussi 2 jours après l'exposition de culture cellulaire de l'hippocampe à l'acide kaïnique, et ils ont obtenu les mêmes résultats in

vivo qu'in vitro. Cette observation indique que le métabolisme des lipides au niveau des lésions a changé. En effet ils ont proposé qu'après les lésions, l'accumulation de cholestérol et des phospholipides s'est accrue, ce qui explique le besoin de l'apoD et E pour les transporter durant la période de restructuration. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité des cellules gliales après le traitement à l'acide kaïnique a conduit à une action directe des cytokines sur les astrocytes qui synthétisent les apolipoprotéines (Nadler *et al.*, 1980). Une étude récente propose un rôle protecteur pour l'apoD humaine qui a été ajoutée directement sur les neurones de l'hippocampe de rat en culture, préalablement traités à l'acide kaïnique. En effet, ils ont proposé que l'apoD, en se liant à l'acide arachidonique et le cholestérol, empêche leurs oxydations en produits neurotoxiques tels que le 4-hydroxynonenal (HNE-4) et le 7-ketocholéstrol (7KC) (He X *et al.*, 2009). Il a été montré que l'acide kaïnique induit l'expression de différentes protéines impliquées dans la régulation de la mort programmée (apoptose) dans les cellules telles que la p53 et la Caspase-3 (Djebaili *et al.*, 2002). Il peut aussi provoquer l'expression du gène Bax dans les neurones du système nerveux central des souris. Cette surexpression de Bax détruit l'équilibre fragile du ratio bcl-2 : bax (anti-apoptique : pro-apoptique) qui détermine la survie ou la mort suite à un stimulus apoptique et accélère donc la mort de la cellule (Oltvai *et al.*, 1993). L'expression de certaines protéines telle que HSP-70(heat shock protein) peut être provoquée aussi après traitement à l'acide kaïnique pour protéger les neurones et réparer les neurones endommagés (Vass *et al.*, 1989). Cependant, aucune étude n'a été faite afin de clarifier le rôle possible de l'apoD (direct ou indirect) sur l'apoptose déclenché par l'acide kaïnique.

Certains ligands de l'apoD, comme la prégnénolone, peuvent bloquer les canaux Ca^{++} dans les neurones de CA1 de l'hippocampe (Robel *et al.*, 1995). L'œstrogène provenant des astrocytes, un autre ligand de l'apoD est connu de jouer un rôle en prévenant la mort neuronale, en favorisant la régénération neuronale. Un effet antioxydant, anti-apoptotique (via le facteur apoptotique bcl2) des œstrogènes a été proposé. L'étude suggère également un effet anti-excitotoxique des œstrogènes en bloquant les récepteurs de type NMDA (Jones *et al.*, 1993 ; Behl, 1997; Weaver *et al.*, 1997). Les mécanismes moléculaires de la dégénérescence neuronale sont souvent inconnus. Cependant, selon le type de pathologie, on a pu impliquer des dysfonctionnements mitochondriaux, le stress oxydatif et inflammatoire, l'accumulation de protéines altérées, des mécanismes pro-apoptotiques et des phénomènes

d'excitotoxicité. Il est important de considérer qu'en fait l'excitotoxicité induisant la neuropathologie peut être impliquée non seulement dans l'épilepsie, mais dans les maladies neurologiques comme l'accident cérébrovasculaire (CVA) et le neurotrauma, aussi bien que la neurodégénération chronique comme l'Alzheimer, le Parkinson et la Sclérose en plaque.

CHAPITRE II

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Injection

Les souris FVB mâles, transgéniques et non-transgéniques, entre 4 et 5 mois, ont été choisies pour les raisons suivantes : la lignée FVB montre des lésions plus sévères et des convulsions plus fortes en réaction à l'acide kaïnique et les souris moins âgées montrent plus de résistance aux effets excitotoxiques de l'acide kaïnique. Les cycles hormonaux féminins peuvent causer une variation dans l'expression de l'apoD, raison pour laquelle les femelles ne sont pas sélectionnées dans cette expérience. Les souris sont réparties en 4 groupes : des transgéniques injectées à l'acide kaïnique, des transgéniques injectées au PBS (Phosphate-Buffered Saline), des souris de type sauvage injectées à l'acide kaïnique et des souris de type sauvage injectées au PBS. L'injection a été faite de façon intrapéritonéale avec de l'acide kaïnique dissous dans du PBS puis filtré. Différentes doses de l'acide kaïnique (25, 20 et 15 mg/kg) ont été testées pour déterminer la dose qui cause la surexpression de l'apoD mais qui ne tue pas les souris ; finalement la dose de 15 mg par kilogramme de poids corporel de souris a été déterminé assez efficace pour le reste de l'étude. Ensuite, les souris ont été filmées pendant 2 heures suivant l'injection. Le temps de latence, le nombre et la durée des convulsions, le temps entre chaque convulsion, le taux de mortalité et le changement de comportement de chaque souris sont relevés. Les souris ont été placées dans les mêmes cages et les mêmes conditions qu'avant l'injection et elles ont été pesées avant et une semaine après l'injection du kaïnate ou du PBS, afin de calculer le changement du poids. Le temps post-injection pour les souris témoins traitées au PBS est une semaine. Les animaux ont été traités selon les recommandations du Guide canadien pour l'utilisation des animaux.

2.2 Prélèvement du cerveau

Vingt quatre heures, trois jours et une semaine après l'injection, les souris sont euthanasiées dans la chambre à CO₂. Les cerveaux sont ensuite prélevés, puis l'hippocampe, le cervelet, le cortex et le reste du cerveau sont séparés et immédiatement congelés à -80°C. D'autres cerveaux entiers sont prélevés et fixés dans l'acide acétique 4% en vue d'être fixés dans la paraffine et d'être analysée par le test TUNEL.

2.3 Analyse de l'expression de l'ARNm chez les souris transgéniques et les souris de type sauvage

2.3.1 Extraction d'ARN des tissus de souris :

L'ARN total est extrait d'une moitié de l'hippocampe et d'un fragment du cortex, du cervelet et du reste de cerveau avec le TRIZOL, une solution à base de guanidine isothiocyanate et de phénol. Les tissus (10-20 mg) sont homogénéisés dans 800 µl de réactif TRIZOL. Les échantillons sont incubés 5 minutes à la température de la pièce. Puis la séparation des ARN de l'ADN est effectuée par l'ajout de Chloroforme et une centrifugation à froid et à haute vitesse ($>10000 \times g$). Les ARN sont retenus dans la phase aqueuse tandis que l'ADN et les protéines sont précipités dans la phase organique. Les ARN sont alors précipités par l'iso-propanol. Le précipité est lavé par une solution à 75% d'éthanol, puis séché à l'air, afin d'éliminer l'éthanol qui pourrait empêcher la dissolution complète du précipité. Le précipité est dissous à 4°C dans de l'eau distillée traitée sans ribonucléase. Les échantillons d'ARN sont dosés par spectrophotométrie. Il est à noter que toutes les manipulations sont effectuées dans des conditions sans RNases.

2.3.2 Électrophorèse d'ARN sur gel d'agarose

Dix microgrammes de chaque échantillon sont traités dans un milieu contenant du MOPS 1X (1X MOPS = 20 mM d'acide 3-N-morpholino-propanesulfonique, 2 mM NaOAc, 1mM EDTA), 17.5% formaldéhyde, 50% formamide et 5 µg/ml bromure d'éthidium et chauffés pendant 10 minutes à 70°C avant le chargement. L'ARN est chargé sur un gel d'agarose 1.5% contenant de la formaldéhyde et du tampon MOPS 10X. La migration est effectuée à 80 volts pendant 4-5 heures.

2.3.3 Transfert d'ARN de type Northern

Après la migration, l'ARN est transféré par capillarité sur une membrane de nylon dans du 20X SSC (standard saline citrate) pendant 18 heures. L'ARN est ensuite fixé à la membrane en l'exposant 5 minutes à la lumière UV. Les membranes d'ARN sont hybridées avec des sondes d'ADN radioactives tel que décrit ci-dessous.

2.3.4 Extraction de l'ADNc d'apoD à partir d'un plasmide

Pour obtenir l'ADNc de l'apoD souris, 50µg de l'ADN plasmidique sont digérés avec les enzymes Hind III et XbaI (BioLabs) pendant 16 heure à 37°C et pour l'ADNc de l'apoD humain, 50µg de l'ADN sont également digérés avec les enzymes SacI et Tpl (BioLabs) pendant 16 heures à 37°C. Ensuite les échantillons sont chargés sur un gel d'agarose et migrés à 100 volts pendant environ 3 heures. L'extraction de l'ADN de l'agarose est faite à l'aide d'une trousse d'extraction d'ADN QUIAEX II Gel extraction kit (Quiagen). L'ADN est élué dans 20µl d'eau ultra pure.

2.3.5 Préparation d'une sonde moléculaire radioactive

Pour faire la sonde, 20ng d'ADN sont utilisés, dans un volume de 8 µl. L'ADN est dénaturé par chauffage à 100°C pendant 3 minutes puis placé sur glace. Trente microlitres d'un tampon contenant des oligonucléotides aléatoires et les dNTPs (20mM Tris-HCL pH 7.5, 0.25 mM dGTP, dATP, dTTP, 8mM MgCl₂, 0.3 U(dXTP) 6, 10 mM DTT) sont rajoutés à l'ADN. On ajoute 1µl de fragment Klenow de l'ADN polymérase (Amersham Biosciences) et 20 µCi de (α³²P) dCTP. Puis, on incube 15 minutes à 37°C. On ajoute 1/10 de volume d'ARNt (1 mg/ml), 1/10 de volume de NaOAC 3M et un volume d'éthanol pour ensuite précipiter la sonde avec une centrifugation à 13000 ×g pendant 15 minutes. Puis l'ADN est suspendu de nouveau dans 100 µl d'eau ultra pure et 500 µl d'ADN de sperme de Hareng.

2.3.6 Hybridation de membrane avec une sonde radioactive

La membrane est préhybridée dans un tampon de préhybridation (50% formamide, 25% de 20X SSC, 5X de solution Denhard, 0.5% SDS) avec 10 mg d'ADN de sperme de saumon dénaturé à la chaleur. Après 30 minutes de préhybridation à 42° C, le tampon est vidé et changé par 10-20 ml de tampon d'hybridation (50% formamide, 20% Dextran sulfate, 20%

de SSPE (SSPE= NaCl 3M, EDTA 0.02 M, Phosphate mono et diabasique 50/50 0.2M), 5X de solution Denhardt (50X Denhardt= 1% Ficoll 400, 1% polyvinipyrrolidone, 1% albumine de sérum bovine) et 0.5% SDS). La sonde est ensuite dénaturée à 100°C pendant 5 minutes, puis ajoutée dans la bouteille d'hybridation avec la membrane. L'hybridation dure 16 heures à 42°C. Après l'hybridation, la membrane est lavée entre 15 minutes et une heure avec un tampon 2XSSC, 0.1% SDS à 42 ° C, et si nécessaire dans un tampon 0.1%X SSC, 0.1% SDS à 65°C. La membrane est alors exposée à un écran phosphorimager K-screen (Kodak), puis lue à l'aide du PhosphorImager et analysée avec Quantity One.

2.4 RT-PCR semi quantitatif pour analyser l'ARNm d'apoD souris, humain, GFAP, COX-2 et Actine

La réaction reverse transcriptase : Les ARN messagers sont convertis en ADNc simple brin par l'action de la transcriptase inverse grâce à la trousse OmniScript RT (Qiagen) en présence d'oligo (dT). Après la synthèse des ADNc simple brin pendant une heure à 37°C, l'enzyme de transcriptase inverse a été inactivée pendant 5min à 95°C. Les ADNc sont ensuite conservés à -20°C. La PCR (ou amplification par réaction de polymérisation en chaîne) est une méthode permettant d'amplifier in vitro des fragments d'ADN. Elle nécessite l'utilisation d'une paire d'oligonucléotides capables de s'hybrider sur l'ADN matrice de façon antiparallèle. Ces oligonucléotides sont utilisés comme amorce par une ADN polymérase thermostable qui synthétise le brin complémentaire. Les cycles d'amplification sont composés de trois étapes: la dénaturation de l'ADN matrice, l'hybridation des amorces et la polymérisation à partir des amorces. Le volume réactionnel final de 25 µL contient: 0,5 unité de Taq polymérase Qiagen, son tampon associé, 0,1 mM de chaque oligonucléotide, 50 mM de chaque dNTP (Qiagen) et la matrice d'ADN. Le programme d'amplification est le suivant: 5 min à 94°C, suivies de 23 à 35 cycles (dépendamment de l'abondance du transcrit) de 30 s à 94°C puis 1 min à 53 à 60°C (dépendamment de la T_M des amorces) et 2 min à 72°C. Ensuite le milieu réactionnel est maintenu en attente à 4°C. Plusieurs températures (de 53 à 60°C) ont été testées pendant l'étape d'hybridation des oligonucléotides, car la température optimale est en fonction de leur séquence. La durée de polymérisation (étape à 72°C) peut varier en fonction de la taille de l'amplifiat attendu. Les amorces utilisées sont:

ApoD S: 5' à 3' sens	CGGGCAGTTCGCTTGATCTGT
5' à 3' anti-sens	CGATTGTCTGTTGTGCCCAGTC
ApoD H: 5' à 3' sens	CACCTTGGGAAGTGCCCCAA
5' à 3' anti-sens	TTACGAGAGAGCTTGGGGCAGT
GFAP : 5' à 3' sens	ATGCCACGTTTCTCCTTGTC
5' à 3' anti-sens	CAGCCTCAGGTTGGTTTCAT
Cox-2 : 5' à 3' sens	CTGGGCCATGGAGTGGACTTA
5' à 3' anti-sens	CCTTCTCTCCTGTAAGTTCTTCAA
Actine : 5' à 3' sens	TGACGGGTCACCCACACTGTG
5' à 3' anti-sens	CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATGGAGGG

Pour visualiser les résultats, 5 µL sont déposés sur gel d'agarose coloré au Bromure d'éthidium. Les fragments d'ADN sont séparés selon leur taille par migration au sein d'un gel d'agarose horizontal baignant dans une solution de TAE 1X (Tris-acétate 40 mM ; EDTA 1 mM ; pH8, 0). La concentration en agarose varie entre 1,5% et 2% (poids/volume) suivant la taille des fragments à séparer ou à visualiser. Le temps et l'intensité de la migration varient en fonction de la taille des fragments à séparer et de la concentration du gel. Le marqueur de taille déposé est le "100 pb ladder" (BioBar) pour estimer la taille d'un fragment. Après migration, le gel est baigné dans une solution de bromure d'éthidium (1 mg/ml) pendant 10 min puis rincé à l'eau distillée. Le gel éclairé aux UV est en suite photographié par une caméra CCD. Puis la densité des bandes a été mesurée à l'aide du programme phosphoimager. La quantification de densitométrie a été faite en fonction d'un gène témoin d'expression stable (Actine).

2.5 Analyse de l'expression de la protéine apoD endogène et transgène (apoD humaine) chez les souris transgéniques et les souris de type sauvage

2.5.1 Extraction des protéines du cerveau de souris

Les moitiés de l'hippocampe, du cortex, du cervelet et du reste du cerveau de chaque souris sont homogénéisées dans un tampon (50mM Tris-HCl pH 7.5, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 0.2% Triton100X et l'inhibiteur de protéase (Roche)) avec un mortier et un pilon sur glace. Les échantillons sont incubés à 4°C pendant 30 min, ensuite soniqués et centrifugés à

4°C pendant 10 minutes et à vitesse maximale. La concentration de protéine est alors dosée par la méthode Bradford (Biorad) par comparaison avec une courbe étalon de BSA (*Bovine Serum Albumin*).

2.5.2 Électrophorèse des protéines sur le gel de polyacrylamide-dénaturant (SDS-PAGE)

Les échantillons de protéines sont séparés par électrophorèse sur un gel d'entassement (0.19M Tris-HCl pH 6.8, 4% acrylamide, 0.04% bis-Crylamide, 0.15% de SDS, 0.1% persulfate d'ammonium, 0.05% TEMED (N, N, N', N'- tetraméthyléthylenediamine)) et ensuite un gel de séparation (380mM Tris-HCl pH 8.8, 12% acrylamide, 0.3% bis-acrylamide, 0.1% de SDS, 0.1% persulfate d'ammonium, 0.05 % TEMED). Des échantillons de 30 µl contenant 20 µg de protéines mélangées dans un tampon de chargement (180mM Tris-HCl pH 6.8, 6% SDS, 30% glycérol, 30% DTT et bromophénol) sont dénaturés pendant 10 min à 100°C puis chargés sur le gel. La migration est réalisée à 100 volts pendant environ 2 heures dans du tampon d'électrophorèse (25mM Tris-base, 200 mM glycine, 0.1% SDS).

2.5.3 Transfert de protéines de type western

Après la migration, les protéines du gel sont transférées sur une membrane de Polyvinylidène difluoride (PVDF) préalablement trempée dans le méthanol pendant 1 minute puis réhydratée dans l'eau. Le transfert est effectué dans un appareil Trans-blot Cell (Biorad) pendant 1 heure à 200 milliampères dans un tampon de transfert (25mM Tris-base, 225mM glycine, 20% méthanol).

2.5.4 Immunobuvardage

La membrane avec les protéines est d'abord saturée pendant 1 heure dans une solution de blocage (10mM Tris-HCl pH7.4, 0.15M NaCl, 0.05% Tween) avec 10% de lait en poudre. L'anticorps primaire (monoclonal de souris anti-apoD humaine (2B9) avec une concentration de 1:100 000, polyclonal de lapin anti-apoD de souris avec une concentration de 1:1000, monoclonal de chèvre anti- GAPDH (Calbiochem) avec une concentration de 1:150 000 ou monoclonal de souris anti-caspase-3 avec une concentration de 1: 2000) est ajouté et le mélange est agité pendant 16 heures. La membrane est lavée pendant une heure avec du PBS1%- Tween 2%. Ensuite l'anticorps secondaire respectif couplé au HRP est ajouté et

maintenu pendant 1 heure. La membrane est lavée et révélée avec un substrat chimioluminescence de HRP (Millipore) puis exposée à un film autoradiographique (Kodak).

2.6 Fixation

2.6.1 Inclusion des cerveaux dans la paraffine pour obtenir des sections

Les cerveaux entiers préalablement fixés dans 10ml acide acétique glacial 4%- éthanol à 4°C, sont rincés avec de l'éthanol 70% pendant une heure à 4°C, puis déshydratés dans l'éthanol 95%-100% à 4°C pendant 5 heures, ensuite infiltrés par le xylène pendant 5 heures. Puis ils sont inclus dans la paraffine à 60°C. On renouvellera la paraffine jusqu'à ce que l'odeur du xylène disparaisse, pendant environ 6 heures. Toutes les étapes sont effectuées sous agitation. Ensuite, les cervaux sont placés dans un moule afin de refroidir et permettre la coupe.

2.6.2 Préparation des lames

Les tissus sont coupés en tranches fines de 10 micromètres à l'aide d'un microtome, fixés sur lame (prétraitées au silane) pendant la nuit à 37°C et ensuite déparaffinés avec du xylène et de l'éthanol. La concentration de l'éthanol sera diminuée à chaque étape jusqu'à 50%. Ensuite ils sont incubés dans du NaCl 0,85% pendant 5 minutes puis lavés avec du PBS 1X. Les tissus sont traités avec 4% formaldéhyde-PBS, puis lavés avec du PBS 1X, afin d'être bien collés sur les lames pour le reste de traitement.

2.7 TUNEL

Le test de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling*) est effectué sur les tranches fines de 10 micromètres de cerveaux afin de détecter les cellules en apoptose. L'apoptose est la mort cellulaire programmée qui survient dans des conditions physiologiques comme le développement et aussi dans des conditions pathologiques telles que les maladies neurodégénératives. Le processus apoptique commence par la contraction des cellules et la condensation de la chromatine suivie par la fragmentation de l'ADN. Le TUNEL est l'une des techniques pour détecter l'ADN clivé dans les dernières phases de l'apoptose. Le test de TUNEL a été fait à l'aide d'une trousse (Clontech) et selon le protocole décrit ci-dessous : les tissus sont perméabilisés dans 20 µg/ µl de protéinase K

puis immergés dans du Formaldéhyde 4% - PBS pendant 5min et sont ensuite lavés avec du PBS 1X. Afin d'avoir des témoins positifs pour le test de TUNEL, les tissus TUNEL-positifs sont séparés et traités avec du tampon DNaseI (40mM Tris-HCL, PH 7,9; 10mM NaCl ; 6mM MgCl₂ ; 10mM CaCl₂), puis lavés plusieurs fois avec de l'eau puis du PBS 1X. Afin de procéder à l'étape de marquage, les tissus sont recouverts par le tampon d'équilibration (200mM Potassium cacodylate, 25mM Tris-HCl pH6.6, 0,2mM DTT, 0,25mg/ml BSA, 2,5mM Cobalt chloride) contenant les nucléotides Mix et l'enzyme TDT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*) (fournis par la compagnie) pendant 1 heure à 37°C, dans l'humidité et à l'abri de la lumière. Pour terminer la réaction, les lames sont lavées avec du SSC 2X (0,3M NaCl, 30mM Na₃Citrate.H₂O), puis lavées 2 fois avec du PBS 1X. Afin de colorer les noyaux en rouge, on utilise l'iodure de propidium (PI) avec une concentration de 0,5 µg/µl pendant 10 minutes. Ensuite les lames sont lavées à deux reprises avec de l'eau distillée. Toutes ces étapes sont effectuées à l'abri de la lumière et dans l'humidité. Afin de les conserver, les lames sont recouvertes d'un réactif anti-affadissement (Clontech) et de lamelles. Les cellules en apoptose exhibent la fluorescence verte venant du noyau en utilisant un filtre fluorescent standard (520 ± 20 nm). Toutes les cellules marquées avec du PI émettent la couleur rouge fluorescente à > 620nm venant du noyau.

2.8 Approche statistique

Les expériences qui consistent à l'analyse génique ou protéique par RT-PCR, Northern et Western blot ainsi que le changement du poids sont effectuées sur 5 souris par génotypage et par condition et ensuite sont analysées par le test ANOVA. Les expériences histologiques qui consistent au test de TUNEL sont effectuées sur 3 souris par génotypage et par condition. L'étude de comportement a été faite sur un minimum de 7 souris par génotypage et ensuite analysée par le test ANOVA. Les valeurs ont été considérées significatives à $p < 0,05$. Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± SD.

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 L'acide kaïnique induit la surexpression de l'apoD endogène

Tout d'abord, dans le but de valider le modèle de neurodégénérescence induit par l'acide kaïnique qui est aussi associé avec une surexpression de l'apoD, les souris ont subi une injection intrapéritonéale avec l'acide kaïnique préalablement stérilisé et filtré. Différentes doses de l'acide kaïnique (25, 20 et 15 mg/kg) ont été injectées chez des souris de type sauvage, afin déterminer la dose qui pourra induire la neurodégénérescence (mesure de l'apoptose par la méthode de TUNEL) et en même temps la surexpression de l'apoD (par northern blot) mais qui ne tue pas les souris (résultat non-montré). Finalement une dose de 15 mg de l'acide kaïnique pour 1kg de poids corporel de souris a été déterminée assez efficace. Ensuite pour déterminer si l'acide kaïnique peut moduler de façon significative la transcription du gène de l'apoD, nous avons fait une courbe d'expression en fonction du temps et les cerveaux ont été prélevés 24h, 3 jours et 7jours après l'injection. Différentes parties du cerveau (l'hippocampe, le cortex, le cervelet et le reste) ont été étudiées séparément afin de mesurer l'expression génique (RT-PCR semi-quantitatif et Northern) et protéique (immunoblot) de l'apoD, toujours en comparant avec les souris contrôles injectées au PBS (qui n'a aucun effet sur le cerveau). La RT-PCR réalisée en utilisant des amorces spécifiques d'apoD souris démontre (fig. 3.1.A) une surexpression significative (environ 2 fois) de l'ARNm d'apoD endogène dans l'hippocampe des souris de type sauvage (wt) 3 jours après l'injection de l'acide kaïnique en comparaison avec les souris de type sauvage injectées au PBS comme contrôle. Le gène d'actine a servi comme un contrôle interne. On a confirmé cette réponse par un transfert de type Northern (fig. 3.1.B), en utilisant la sonde d'apoD souris, ainsi que la sonde de GAPDH comme contrôle interne. Donc, les résultats

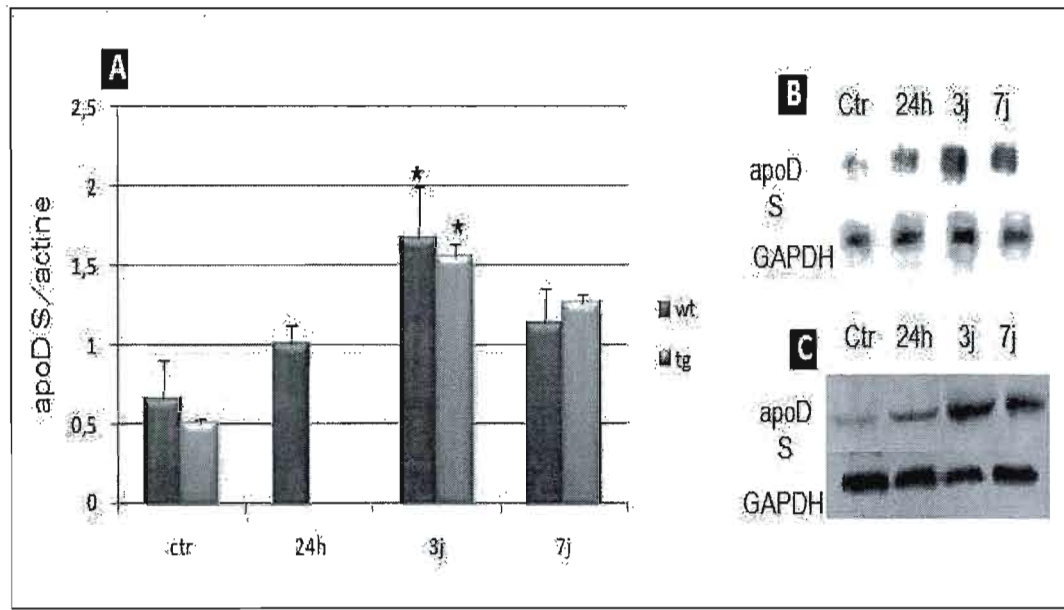


Figure 3.1- Induction de l'expression de l'apoD endogène dans l'hippocampe suite au traitement à l'acide kaïnique.(A) L'expression d'ARNm d'apoD endogène mesurée par RT-PCR semi-quantitatif, 24 h , 3 et 7 jours après l'injection de 15mg d'acide kaïnique chez les souris transgéniques (tg) et les souris de type sauvage (wt). Le niveau d'expression d'ARNm a été quantifié par densitométrie. Les valeurs ont été normalisées par l'expression de l'actine . L'astérisque (*) représente $p < 0,05$ par rapport aux contrôles injectées au PBS. (B) Analyse des niveaux d'expression d'ARNm d'apoD endogène (apoD S) par transfert de type Northern en comparaison avec le gène contrôle GAPDH chez les souris de type sauvage. (C) L'expression de la protéine d'apoD endogène par le transfert de type Western chez les souris de type sauvage. L'expression de GAPDH a été incluse comme un contrôle interne. Ctr représente les contrôles injectées au PBS. (n=5 pour les wt et n=2 pour les tg).

confirment que l'acide kaïnique provoque la transcription du gène d'apoD dans l'hippocampe 3 jours après l'injection. Finalement, afin de vérifier que la traduction de l'ARNm en protéine se produisait bien et ainsi confirmer la même réponse au niveau des protéines, les protéines de l'hippocampe des souris injectées et les contrôles injectées au PBS furent extraites et analysées par un transfert de type Western avec un anticorps anti-apoD de souris (fig. 3.1.C). On voit toujours l'expression la plus forte de l'apoD, 3 jours après l'injection et elle a tendance à diminuer à 7 jours. En ce qui concerne les souris transgéniques (tg), on obtient le

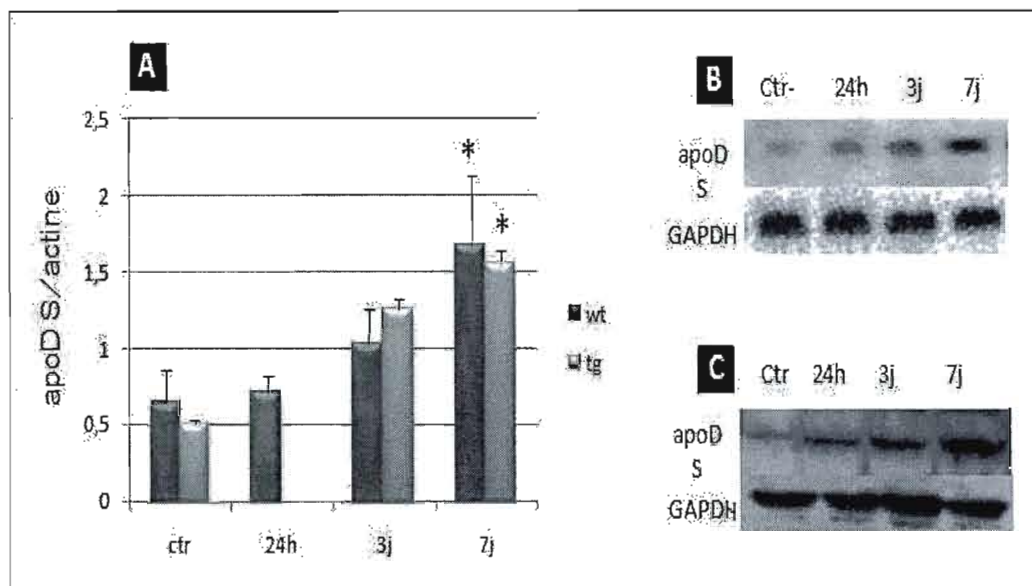


Figure 3.2- Induction de l'expression de l'apoD endogène dans le cortex suite au traitement à l'acide kaïnique.(A) L'expression d'ARNm d'apoD endogène mesurée par RT-PCR semi-quantitatif, 24 h , 3 jours et 7 jours après l'injection de 15mg d'acide kaïnique chez les souris transgéniques (tg) et les non-transgéniques (wt). Le niveau d'expression d'ARNm a été quantifié par densitométrie. Les valeurs ont été normalisées par l'expression de l'actine . L'astérisque (*) représente $p < 0,05$ par rapport au contrôle injecté au PBS. (B) Analyse des niveaux d'expression d'ARNm d'apoD endogène (apoD S) par transfert de type Northern en comparaison avec le gène contrôle GAPDH chez les souris de type sauvage. (C) L'expression de la protéine d'apoD endogène par le transfert de type Western chez les souris de type sauvage. L'expression de GAPDH a été incluse comme un contrôle interne. Ctr représente les contrôles injectés au PBS. (n=5 pour les wt et n=2 pour les tg).

même profil que pour les non-transgéniques (fig 3.1.A), ce qui veut dire que la surexpression de l'apoD endogène (souris, apoD S) survient 3 jours après l'injection dans l'hippocampe des transgéniques et qu'elle commence à diminuer à 7 jours. Il faut mentionner que nous disposions de très peu de souris transgénique au moment de réaliser cette étude, la raison pour laquelle nous n'avons pas des transgéniques injectées à 24 heures et que nous avons n=2 pour chaque catégorie des souris transgéniques contre n=5 pour les souris de type sauvage. Il faudra donc reconfirmer les réponses pour les transgéniques en augmentant les nombres de souris.

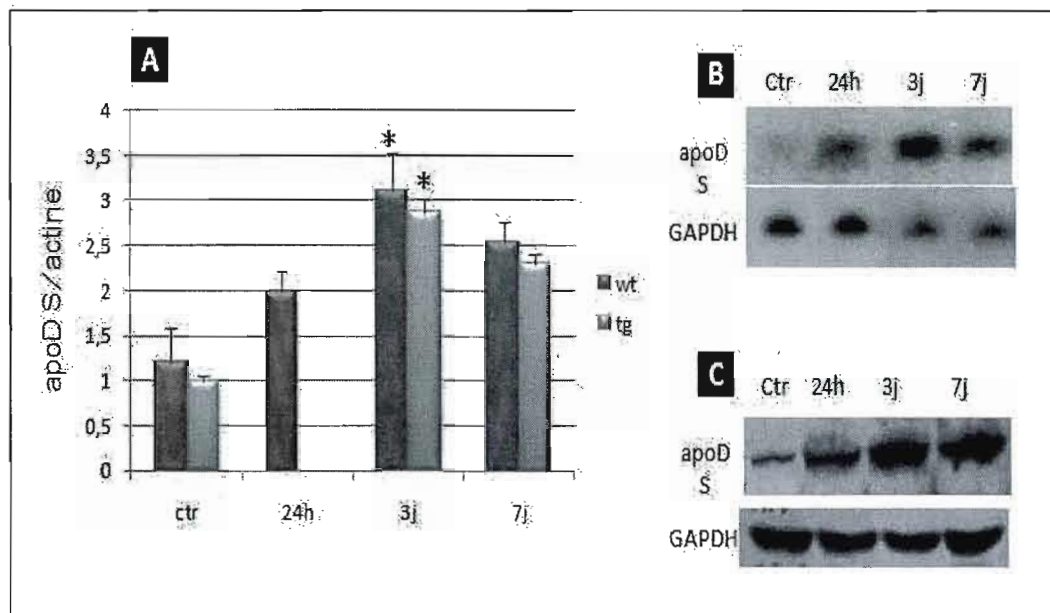


Figure 3.3- Induction de l'expression de l'apoD endogène dans le cervelet suite au traitement à l'acide kaïnique.(A) L'expression d'ARNm d'apoD endogène mesurée par RT-PCR semi-quantitatif, 24 h , 3 jours et 7 jours après l'injection de 15mg d'acide kaïnique chez les souris transgéniques (tg) et les non-transgéniques (wt). Le niveau d'expression d'ARNm a été quantifié par densitométrie. Les valeurs ont été normalisées par l'expression de l'actine . L'astérisque (*) représente $p < 0,05$ par rapport au contrôle injecté au PBS. (B) Analyse des niveaux d'expression d'ARNm d'apoD endogène (apoD S) par transfert de type Northern en comparaison avec le gène contrôle GAPDH chez les souris de type sauvage. (C) L'expression de la protéine d'apoD endogène par le transfert de type Western chez les souris de type sauvage. L'expression de GAPDH a été incluse comme un contrôle interne. Ctr représente les contrôles injectées au PBS. (n=5 pour les wt et n=2 pour les tg).

Dans le cortex (fig. 3.2.A), les résultats obtenus par RT-PCR montrent une surexpression significative (environ 2 fois par rapport au contrôle) 7 jours après l'injection chez les transgéniques et les non-transgéniques. On observe également la même réponse au niveau de l'ARNm mesuré par Northern (fig. 3.2.B), ainsi qu'au niveau de la protéine mesurée par Western (fig. 3.2.C). L'expression de l'apoD semble être commencée avec un peu de retard dans le cortex (3 jours) par rapport à l'hippocampe (24h). Il est possible que cette surexpression continue même 7 jours après l'injection.

L'acide kaïnique induit aussi la transcription du gène d'apoD endogène, quantifiée par RT-PCR, dans le cervelet qui semble être affecté dès 24h après l'injection. La surexpression arrive à son maximum au 3^{ème} jour et ensuite décroît au jour 7 (fig. 3.3.A). Nous avons obtenu le même profil chez les souris de type sauvage et les transgéniques. Les réponses ont été confirmées par un transfert de type Northern au niveau d'ARNm (fig. 3.3.B) et par un transfert de type Western au niveau de la protéine (fig. 3.3.C). On obtient donc l'expression la plus forte de l'apoD endogène au 3^{ème} jour après l'injection dans le cervelet.

En ce qui concerne le reste du cerveau (thalamus, hypothalamus, hypophyse,...), l'expression de l'apoD n'est pas significative, donc le reste du cerveau ne semble pas être affecté par l'acide kaïnique ou du moins l'acide kaïnique ne provoque pas l'expression d'apoD dans cette partie du cerveau. Cette réponse a été obtenue en mesurant l'ARNm de l'apoD endogène par RT-PCR (fig. 3.4.A), ainsi que la protéine par Western blot (fig. 3.4.B) seulement chez les non-transgéniques. Ainsi, le reste du cerveau n'est pas considéré pour la suite de l'étude.

3.2 Expression d'apoD transgène

Afin de vérifier si l'acide kaïnique peut moduler la transcription de l'apoD transgène (apoD H, humaine), le cerveau des transgéniques fut prélevé 3 et 7 jours après l'injection de l'acide kaïnique, l'ARNm d'apoD humaine a été amplifié par RT-PCR à l'aide des amorces d'apoD humaines, ensuite comparé avec des contrôles transgéniques injectées au PBS. Le gène d'actine est utilisé comme contrôle interne. Tel qu'attendu l'expression du gène d'apoD humaine n'est pas modulée suite à l'injection de l'acide kaïnique (fig. 3.5.A). Pour confirmer la réponse au niveau de la traduction, les protéines du cerveau des transgéniques furent extraites aux 3^{ème} et 7^{ème} jours après l'injection et analysées par un transfert de type Western avec un anticorps anti-apoD humaine. En comparant avec les contrôles transgéniques injectées au PBS et en utilisant la GAPDH comme un contrôle interne, le résultat confirme une fois de plus la stabilité de l'expression d'apoD humaine suite à l'injection (fig. 3.5.B).

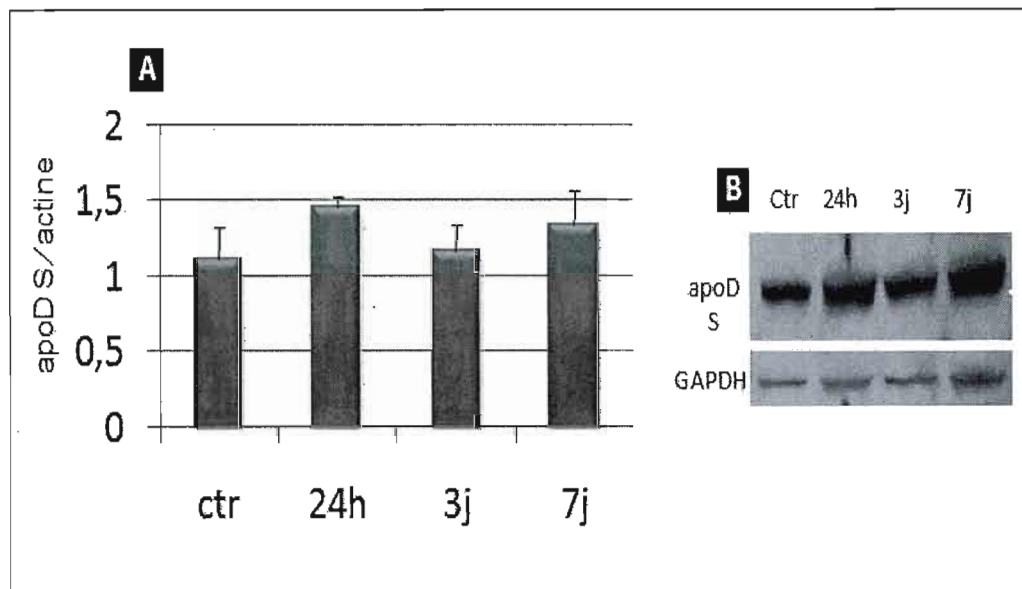


Figure 3.4- Expression de l'apoD endogène dans le reste du cerveau suite au traitement à l'acide kaïnique. (A) L'expression d'ARNm d'apoD endogène mesurée par RT-PCR semi-quantitatif, 24 h, 3 jours et 7 jours après l'injection de 15mg d'acide kaïnique chez les souris de type sauvage. Le niveau d'expression d'ARNm a été quantifié par densitométrie. Les valeurs ont été normalisées par l'expression de l'actine. (B) L'expression de la protéine d'apoD endogène mesurée par western blot chez les souris de type sauvage. L'expression de GAPDH a été incluse comme un contrôle interne. Ctr représente les contrôles injectées au PBS. (n=5)

3.3 L'acide kaïnique induit l'expression de la GFAP

La GFAP (Glial fibrillary acidic protein) est un marqueur spécifique des cellules gliales. Afin de mesurer l'activation de la glie, on s'est intéressé à la modulation de l'expression de GFAP suite à la neurodégénérescence induite par l'acide kaïnique dans différentes parties du cerveau des souris de type sauvage et des transgéniques. L'ARN de différentes parties du cerveau fut extrait séparément, ensuite converti en ADNc afin d'être amplifié par les amorces spécifiques de GFAP. Le gène d'actine a été utilisé comme un contrôle interne. En comparant avec les contrôles injectés au PBS, on démontre que dans l'hippocampe l'expression de la

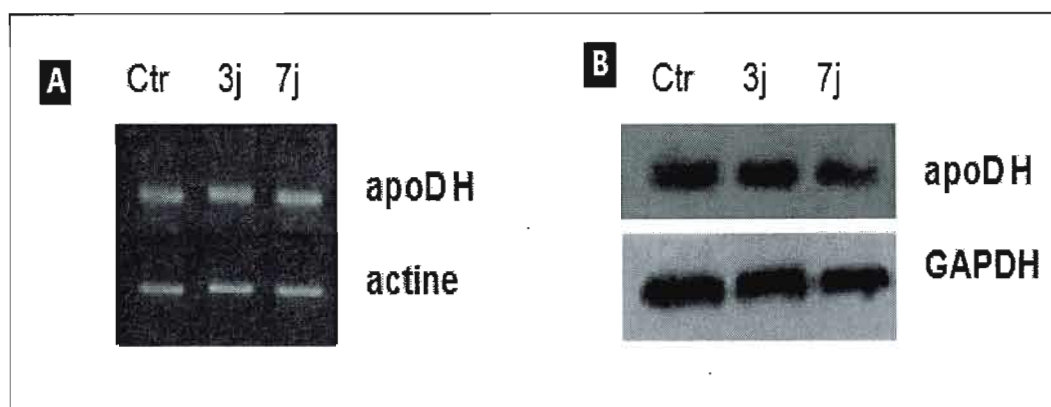


Figure 3.5- Expression stable de l'apoD exogène (humaine, apoD H) suite au traitement à l'acide kaïnique. (A) L'expression d'ARNm d'apoD H mesurée par RT-PCR semi-quantitatif, 3 et 7 jours après l'injection de l'acide kaïnique et comparée au contrôle interne actine chez les transgéniques. (B) L'expression de la protéine d'apoD H mesurée par Western blot. La GAPDH a été incluse comme contrôle interne. Ctr représente les souris transgéniques contrôles injectées au PBS. (n=2)

GFAP survient 3 jours après l'injection et ensuite, on constate une diminution au 7^{ème} jour (fig. 3.6). Dans le cortex, l'induction d'expression de la GFAP semble être avec un peu de retard. Le résultat révèle une augmentation de l'expression 3 jours après le traitement. Cette expression continue à augmenter ainsi 7 jours après l'injection. Il est donc possible qu'elle continue à croître même après 7 jours. L'expression de la GFAP au 7^{ème} jour dans le cortex semble être moins forte chez les transgéniques par rapport aux non-transgéniques. Dans le cervelet des souris de type sauvage, l'acide kaïnique induit la transcription du gène de la GFAP, 24 heures après l'injection qui arrive à son maximum (environ 2 fois plus par rapport au control injecté au PBS) au 3^{ème} jour et ensuite commence à décroître 7 jours après le traitement à l'acide kaïnique. On observe également le même profil dans le cervelet des transgéniques (fig. 3.6). L'expression de la GFAP corrèle donc de façon parfaite avec l'expression de l'apoD endogène.

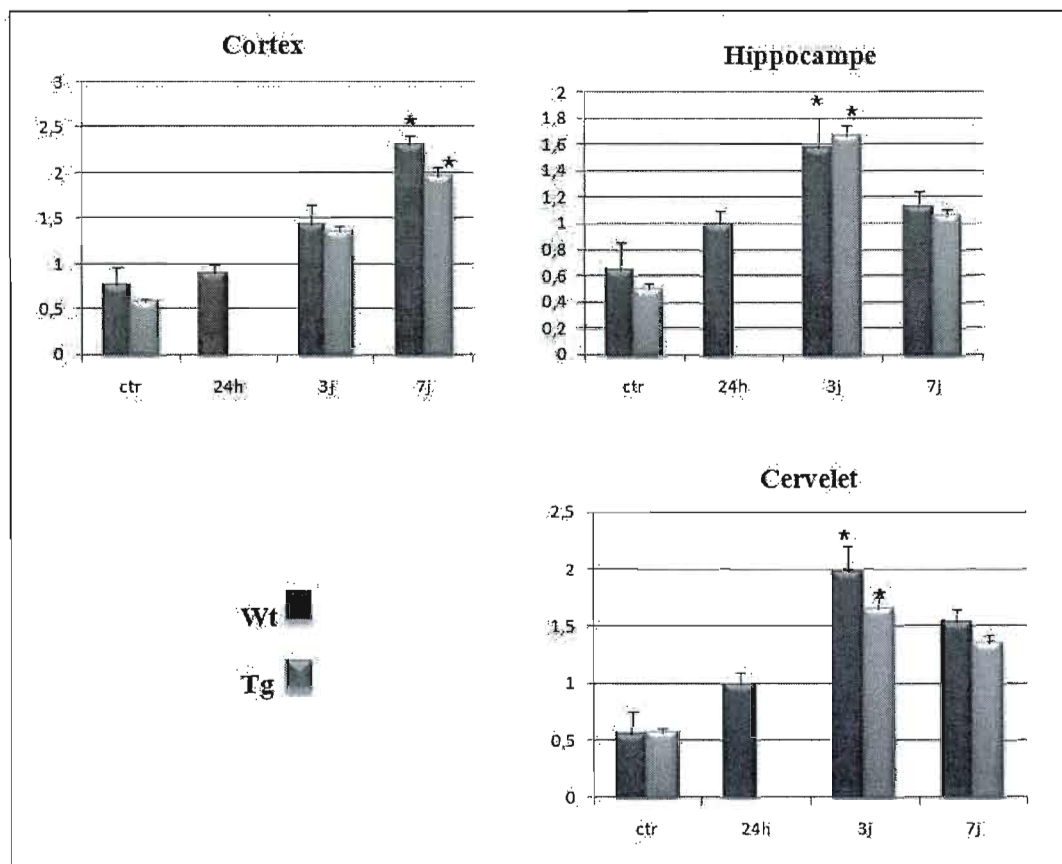


Figure 3.6- Induction de l'expression de GFAP dans le cortex, l'hippocampe et le cervelet des souris de type sauvage (Wt) et des transgéniques (Tg) suite au traitement à l'acide kainique. L'expression d'ARNm de GFAP mesurée par RT-PCR semi-quantitatif, 24 h, 3 et 7 jours après l'injection de 15mg d'acide kainique chez les souris de type sauvage (wt) et les transgéniques (tg). L'expression d'ARNm quantifiée par densitométrie. Les valeurs ont été normalisées par l'expression de l'actine. L'astérisque (*) représente $p < 0,05$ par rapport au contrôle injecté au PBS. (n=5 pour les Wt et n=2 pour les Tg)

3.4 L'acide kainique induit l'expression de COX-2

La cyclooxygénase-2 (COX-2) joue un rôle important dans les maladies neurodégénératives et les troubles neuropsychiatriques tels que l'épilepsie. Cette enzyme permet la formation des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique. Plusieurs

anomalies de neurotransmetteurs, notamment le glutamate jouant un rôle clé dans la physiopathologie de l'épilepsie, ont été signalés. Par ailleurs, on utilise les inhibiteurs de COX-2 dans le traitement des crises épileptiques. Dans le but de vérifier la capacité de l'acide kaïnique à induire l'inflammation chez les souris transgéniques et non-transgéniques, on a mesuré la modulation de l'expression de cette enzyme inflammatoire après le traitement à l'acide kaïnique. Suite à l'extraction de l'ARN de différentes parties du cerveau, l'ARN fut converti en l'ADNc puis les amorces spécifiques permettant d'amplifier le gène de COX-2 ont été utilisées. Les valeurs ont été normalisées à l'aide de l'actine, comme un gène contrôle par densitométrie. En se référant à la figure 3.7 à gauche qui représente les souris de type sauvage traitées (24h, 3 et 7 jours) et les contrôles non traités (ctr), nous avons obtenu un résultat assez intéressant. Après l'injection de 15mg d'acide kaïnique, la COX-2 a été détectée seulement dans l'hippocampe et le cortex des souris de type sauvage ayant des convulsions extrêmement fortes (environ 2 souris sur 5 pour chaque catégorie) et elle a été totalement absente dans le cervelet (fig 3.7, Type sauvage à gauche), et ceci apparaît aussi tôt qu'après 24 heures et son expression ne semble pas être modifiée avec le temps. Mais en augmentant la dose de kaïnate à 20mg la présence de COX-2 devient ubiquitaire et on la détecte également dans le cervelet (fig.3.7, Type sauvage à gauche/ 7j-20mg). Il faut mentionner que l'injection de 15mg d'acide kaïnique cause des convulsions en moins de 15 minutes chez les souris (Tabl. I et tableau supplémentaire II). Cet effet est dose dépendant, ce qui veut dire qu'en augmentant la dose de kaïnate à 20 mg, la gravité et la fréquence des convulsions sont aussi accrues (tableau supplémentaire III). Cependant il semble y avoir une relation entre l'expression de COX-2 et la gravité des convulsions. Chez les transgéniques, l'expression de COX-2 suite à l'injection de 15mg de l'acide kaïnique, semble être moins forte par rapport aux non-transgéniques mais toujours liée aux convulsions (0 à 1 souris sur 2). Le résultat démontre (fig 3.7, Transgénique à droite) une expression plus faible de COX-2 seulement dans l'hippocampe et le cortex. En raison d'un taux élevé de mortalité, les injections de 20mg d'acide kaïnique furent arrêtées, raison pour laquelle nous n'avons pas pu obtenir le résultat pour l'expression de COX-2 chez les transgéniques avec une dose plus élevée d'acide kaïnique (20mg) ainsi que chez les non-transgénique à 3 jours. En raison de peu de souris ayant exprimé la COX-2 suite à l'injection de 15mg de kaïnate (environ 2

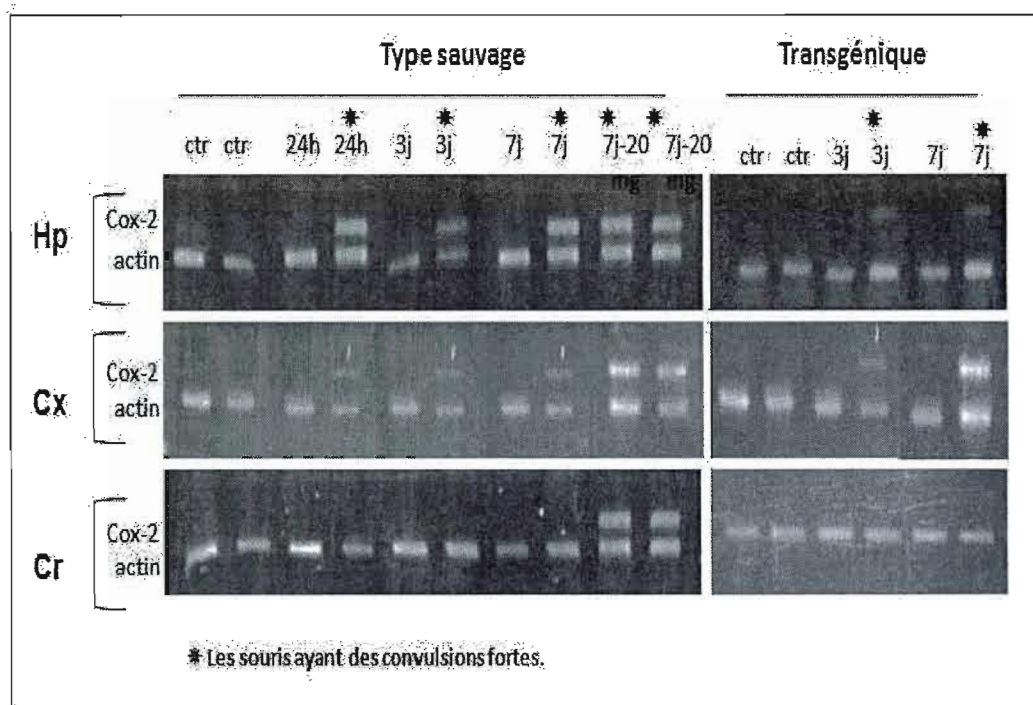


Figure 3.7- Induction de l'expression de COX-2 suite au traitement à l'acide kaïnique. L'expression d'ARNm de COX-2 a été mesurée par RT-PCR semi-quantitatif, 24 h, 3 et 7 jours après l'injection de 15 et 20mg d'acide kaïnique chez les souris de type sauvage (Type sauvage, à gauche) et les transgéniques (à droite) en comparaison avec le gène contrôle actine. L'astérisque représente les souris ayant de très fortes convulsions. Hp, Cx et Cr représentent respectivement l'hippocampe, le cortex et le cervelet. Ctr = souris contrôles injectées au PBS. 7j-20mg = souris injectées avec 20mg d'acide kaïnique et analysée 7 jours après l'injection. (n=5 pour les souris de type sauvage et n=2 pour les souris transgéniques)

souris sur 5 pour les non-transgéniques et 0 à 1 souris sur 2 pour les transgéniques), la comparaison de la quantité de COX-2 exprimée chez les transgéniques et les non-transgéniques n'a pas été représentée dans un graphique.

3.5 L'acide kaïnique induit l'apoptose dans le cerveau des souris

L'apoptose a été mesurée par le test TUNEL effectué sur le cerveau fixé à la paraffine. Quand les cellules subissent l'apoptose ou mort cellulaire programmée, leurs ADN se fragmentent. L'enzyme dTT (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase*) utilisée dans le test

TUNEL est capable d'ajouter des nucléotides fluorescents à l'extrémité 3' des fragments d'ADN. Les cellules marquées de cette façon peuvent être détectées par microscopie confocale. Étant donné que l'acide kaïnique est connu comme un agent apoptotique utilisé comme un modèle dans l'étude de la maladie d'Alzheimer et l'épilepsie, on s'est intéressé à étudier l'apoptose dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet, les zones où une modulation d'apoD suite au traitement à l'acide kaïnique a été constatée. Pour cela, le cerveau des souris contrôles injectées au PBS et des souris injectées avec 15mg d'acide kaïnique a été prélevé, 3 et 7 jours après l'injection et rapidement conservés dans l'acide acétique glacial, afin d'être déshydratés et fixés dans la paraffine. Suite au test TUNEL, les cellules en apoptose émettent une couleur verte fluorescente. Comme on peut le constater sur la figure 3.8, l'acide kaïnique induit l'apoptose dans le cortex, aux 3^{ème} et 7^{ème} jours après le traitement. Le marquage avec l'iodure de propidium (PI) (rouge) à gauche révèle le noyau des mêmes cellules qui ont subi un marquage de TUNEL (vert) à droite. On observe des cellules en apoptose chez les souris de type sauvage aux 3^{ème} et 7^{ème} jours (3j, 7j) alors qu'elles sont indétectables ou absentes chez une souris de type sauvage injectée au PBS (Control). Chez le contrôle avec un marquage de PI, une partie de cortex avec les noyaux des cellules en rouge est remarquable alors que chez les mêmes cellules, l'apoptose est indétectable.

Dans le cervelet, l'acide kaïnique induit également l'apoptose (fig. 3.9). Le résultat de la microscopie confocale révèle des cellules en apoptose (vert) aux 3^{ème} et 7^{ème} jours et les cellules non-apoptotiques chez le contrôle.

L'analyse histologique sur la figure 3.10 révèle aussi une forte induction d'apoptose dans l'hippocampe des souris traitées à l'acide kaïnique, surtout dans les zones CA1 et CA3 de l'hippocampe qui sont aussi les zones les plus endommagées dans la maladie d'Alzheimer. Dans l'hippocampe de la souris contrôle, on observe quelques cellules en apoptose. Ce qui est normal, puisque l'apoptose est une mort cellulaire physiologique généralement programmée nécessaire à la survie de l'organisme et en équilibre avec la prolifération (peu de prolifération dans le cerveau). Mais suite à l'injection de l'acide kaïnique, on constate une forte augmentation d'apoptose provoquée par cet agent apoptotique.

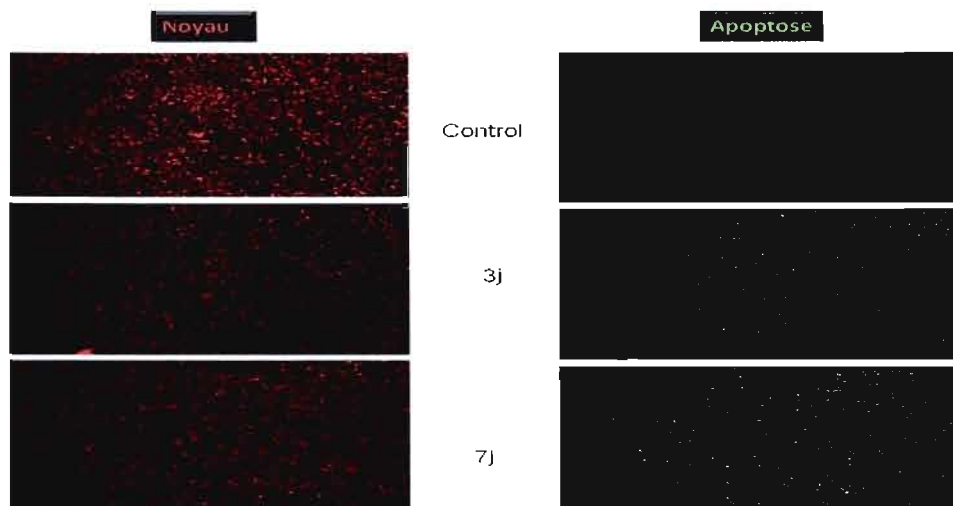


Figure 3.8- Apoptose (TUNEL) dans le cortex après le traitement à l'acide kaïnique. À gauche le noyau des cellules colorées en rouge avec l'iodure de propidium et à droite la même coupe avec un marquage de TUNEL. Les cellules en apoptose émettent une couleur verte. En haut on constate une partie du cortex d'une souris contrôle de type sauvage injectée au PBS (Control), au milieu une partie de cortex d'une souris de type sauvage injectée à l'acide kaïnique et prélevé après 3 jours (3j) et en bas le cortex d'une souris de type sauvage injectée à l'acide kaïnique et prélevé après 7 jours (7j). Le grossissement des images est égale. (n=3)

3.6 Comparer l'apoptose chez les transgéniques et les non-transgéniques

Afin d'étudier le rôle bénéfique de l'apoD, ce qui constitue la deuxième partie de ce projet, nous avons comparé l'apoptose induite par l'acide kaïnique chez les transgéniques et non-transgéniques. En comparant une coupe du cerveau montrant l'hippocampe, le cortex et le cervelet d'une souris de type sauvage (haut) et une transgénique (bas) 7 jours après l'injection de 15mg d'acide kaïnique, comme on peut le constater sur la figure 3.11, l'apoptose semble être moins intense chez les transgéniques. Les deux souris étudiées ayant le même âge et étant soumises aux mêmes conditions, la seule différence est la présence d'apoD supplémentaire dans le cerveau de souris transgéniques. Donc l'apoD semble jouer un rôle en modulant d'apoptose chez ces souris. Sur la figure 3.11, il y a des zones qui semblent être plus fortes en apoptose (image de droite) mais en comparant avec l'image à

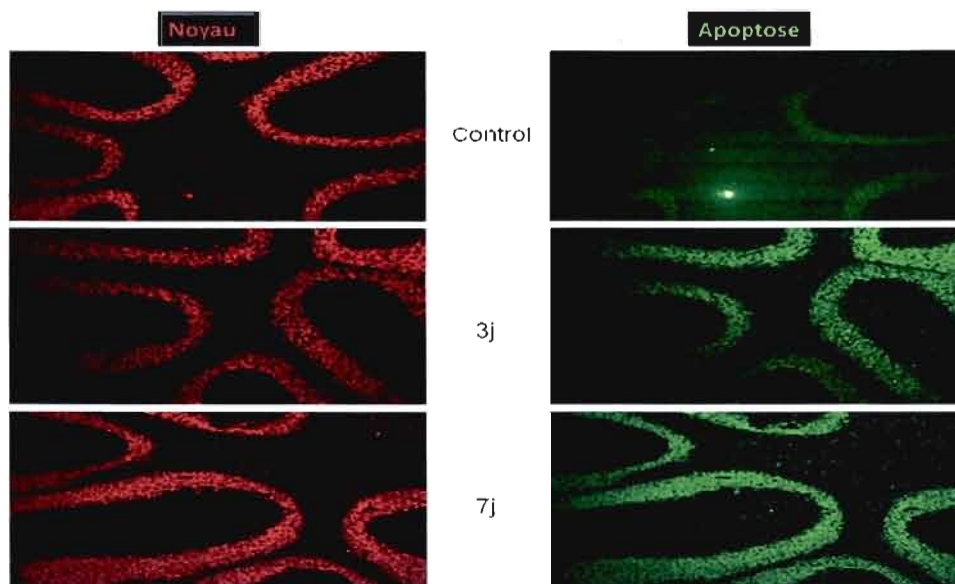


Figure 3.9- Apoptose (TUNEL) dans le cervelet après le traitement à l'acide kaïnique. À gauche le noyau des cellules colorées avec l'iodure de propidium en rouge et à droite la même coupe avec un marquage de TUNEL. Les cellules en apoptose émettent une couleur verte. En haut on constate une partie du cervelet d'une souris contrôlée de type sauvage injectée au PBS (Control), au milieu une partie du cervelet d'une souris de type sauvage injectée à l'acide kaïnique et prélevé après 3 jours (3j) et en bas une partie du cervelet d'une souris de type sauvage injectée à l'acide kaïnique et prélevé après 7 jours (7j). Le grossissement des images est égale. (n=3)

gauche, on réalise que ce sont des zones cellulaires plus concentrées. Dans l'hippocampe des souris transgéniques, on constate une diminution d'environ 40% d'apoptose surtout dans la zone de CA1, par rapport à l'hippocampe de la souris non-transgénique. Dans le cortex des transgéniques, cette diminution est encore plus spectaculaire, elle est estimée à 80% et montre ainsi une différence significative entre les transgéniques surexprimant l'apoD et les souris de type sauvage. Ce résultat a été confirmé séparément chez 3 souris transgéniques et 3 souris de type sauvage et dans tous les cas, une diminution minimale de 30% d'apoptose était notable.

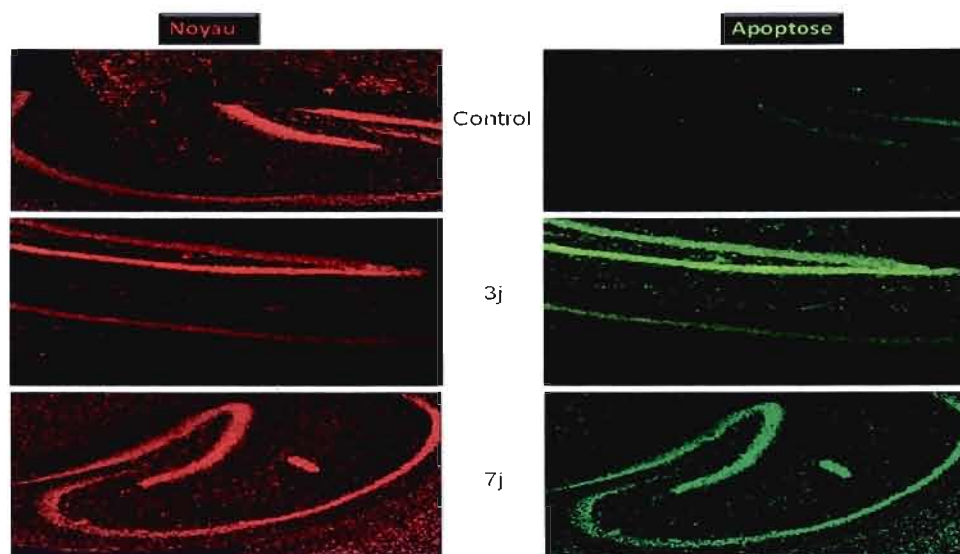


Figure 3.10- Apoptose (TUNEL) dans l'hippocampe après le traitement à l'acide kaïnique. À gauche le noyau des cellules colorées avec l'iodure de propidium en rouge et à droite la même coupe avec un marquage de TUNEL. Les cellules en apoptose émettent une couleur verte. En haut, on constate une partie de l'hippocampe d'une souris contrôlée de type sauvage injectée au PBS (Control), au milieu une partie de l'hippocampe d'une souris de type sauvage injectée à l'acide kaïnique et prélevée après 3 jours (3j) et en bas l'hippocampe d'une souris de type sauvage injectée à l'acide kaïnique et prélevée après 7 jours (7j). Le grossissement des images est égale. (n=3)

3.7 Études de comportement

Des études précédentes ont déjà montré que l'acide kaïnique induit des crises épileptiques ainsi que des convulsions chez les rongeurs. Il était donc pertinent d'étudier le comportement des souris et voir si les souris transgéniques bénéficiant d'apoD supplémentaire résistent mieux aux effets de l'acide kaïnique immédiatement après l'injection. Les souris ont été filmées pendant les 2 heures suivant l'injection. Ensuite, en visionnant les cassettes à plusieurs reprises, le temps de latence, les nombres des convulsions, la durée des convulsions ainsi que la gravité des convulsions ont été notés. Selon Sperk et ses collaborateurs (1985), les convulsions ont été classées en 4 catégories : 1- mouvement de

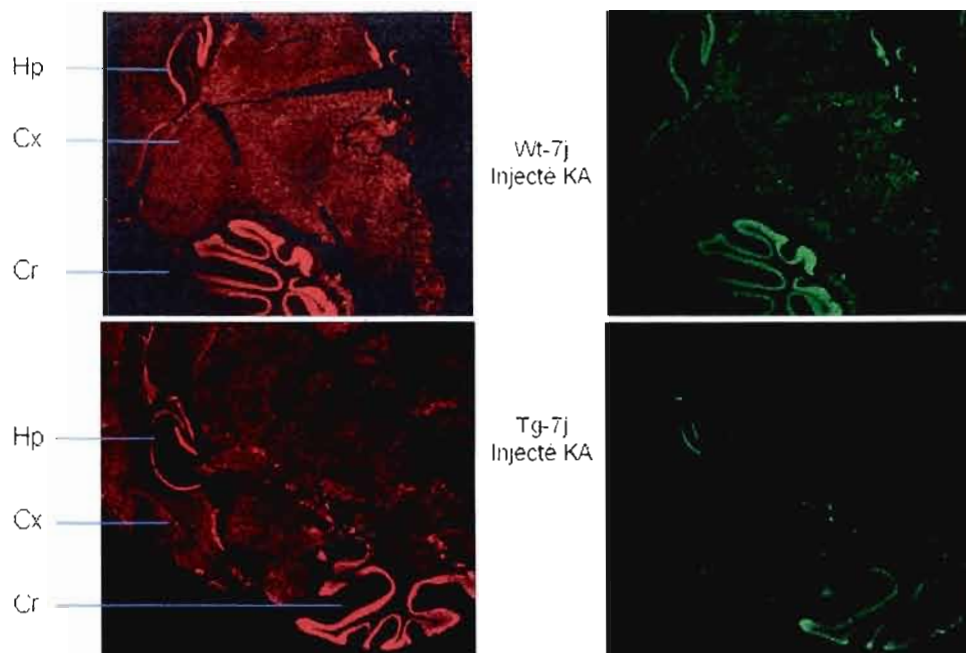


Figure 3.11- Comparaison de l'apoptose (TUNEL) dans le cerveau des transgéniques et les non-transgéniques. Coupe de cerveau d'une souris non-transgénique (haut) et une souris transgénique (bas) injectées avec 15mg d'acide kaïnique et prélevés 7 jours après l'injection. À gauche le noyau des cellules colorées avec l'iodure de propidium en rouge et à droite, la même coupe avec un marquage de TUNEL. Les cellules en apoptose émettent une couleur verte. Hp, Cx, Cr et KA représentent respectivement l'hippocampe, le cortex, le cervelet et le kaïnate. Le grossissement des images est égale.

tête (*shaking head*). 2- les convulsions unilatérales (*unilateral clonic-tonic*): seulement un côté du corps tremble. 3- les convulsions bilatérales (*bilateral clonic-tonic*): les deux côtés du corps tremblent. 4- les convulsions très fortes (*full clonic-tonic*): des convulsions extrêmement fortes où l'animal tombe sur le dos ou saute.

3.7.1 Injection de 15mg d'acide kaïnique

Afin de faciliter la comparaison entre les transgéniques et les non-transgéniques, la moyenne de chaque groupe a été calculée (tabl. I). Les réponses épileptiques ont commencé moins de 15 min après l'injection de 15 mg d'acide kaïnique pour arriver au niveau le plus

élevé aux environs de 2 heures. Cependant, en considérant les écarts types, il ne semble pas y avoir une différence dans le temps de latence, le nombre des convulsions ni la durée totale des convulsions mesurés chez les transgéniques et les non-transgéniques. La seule différence significative réside dans le nombre et la gravité des convulsions qui est moindre chez les transgéniques. En injectant 15 mg d'acide kaïnique, aucune mortalité n'a été détectée. Le tableau supplémentaire II révèle le registre plus détaillé des convulsions épileptiques des souris.

3.8 Changement du poids

Les souris ont été pesées avant et 7 jours après l'injection de l'acide kaïnique. Ensuite, la variation du poids a été évaluée en grammes. Le résultat est représenté sous forme de graphique (fig. 3.12) pour 5 souris par génotype et par condition. Étant donné l'association de l'apoD avec le récepteur de la leptine (un neurotransmetteur régulant la faim) et son rôle de transporteur du cholestérol et des stéroïdes ainsi en supposant un rôle protecteur de l'apoD, il était possible que les souris transgéniques présentent des différences de poids par rapport aux souris de type sauvage et cela avant l'injection même. Mais les résultats chez les contrôles injectés au PBS révèlent que les deux groupes se comportent de la même façon et ne montrent aucune différence significative au niveau de changement du poids pendant une semaine.

Cependant, la question se pose entre les souris non-transgéniques traitées à l'acide kaïnique par rapport à leurs contrôles et les transgéniques traitées à l'acide kaïnique par rapport à leurs contrôles transgéniques. Le graphique révèle une différence significative chez les non-transgéniques traités à l'acide kaïnique et les non-traités. En effet après l'injection, les souris de type sauvages ont perdu du poids dans la semaine suivant le traitement comparativement à leurs contrôles non-traités ; Alors que chez les transgéniques, ce n'est

Tableau I
Étude de comportement (15mg KA)

	Génotype	
	Wt n = 8	Tg n = 7
temps de latence (min)	14 ± 3,19	16 ± 5,17
nombre de convulsion	2,9 ± 1,3	1,6 ± 0,4
moyenne de temps entre les convulsions (min)	5,06 ± 2,03	7 ± 3,4
durée totale des convulsions (min)	2,04 ± 1,98	2,05 ± 2,64
2^{ème} catégorie nombre total de souris avec convulsion	2 ★	0
3^{ème} catégorie nombre total de souris avec convulsion	4	1
souris ayant 1 convulsion	2	1
souris ayant 2 convulsions	1	0
souris ayant 3 convulsions	1	0
4^{ème} catégorie nombre total de souris avec convulsion	4	0
souris ayant 1 convulsion	2	0
souris ayant 2 convulsions	2	0

Les données sont présentées en tant que moyenne ± SEM

★ Ces souris n'ont eu qu'une seule convulsion

pas le cas. Les transgéniques traitées semblent se comporter comme les transgéniques non-traitées (fig. 3.12). Il faut mentionner aussi que les souris testées étaient toutes de lignée FVB, mâles et ayant 4 à 5 mois. Elles ont toutes été nourries et élevées rigoureusement dans des conditions identiques de température, humidité et de lumière.

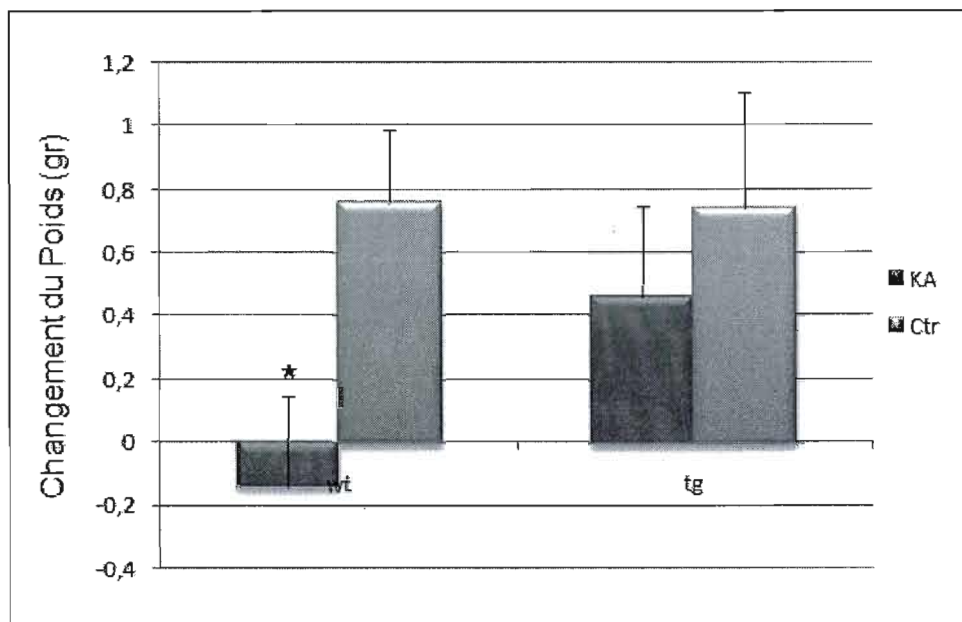


Figure 3.12- Graphique représentant le changement du poids. Le changement du poids chez les transgéniques (n=5) et non-transgéniques (n=5) une semaine après le traitement à l'acide kaïnique. Les valeurs ont été ensuite comparées avec la prise du poids chez les contrôles injectées au PBS durant une semaine. L'astérisque (*) représente $p < 0,05$.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

Des études précédentes ont déjà révélé un rôle pour l'apoD dans la régulation de l'inflammation et suggèrent qu'elle protège de l'encéphalite induite par HCoV-OC43 (Do Carmo *et al.* 2008) ainsi que face au stress oxydatif induit par le paraquat (Ganformina *et al.* 2008). Dans ce projet, on s'est focalisé sur le rôle protecteur de l'apoD face à un agent apoptotique. Nous avons choisi comme modèle, l'injection intrapéritonéale de l'acide kaïnique qui est un analogue de glutamate. L'acide kaïnique est un acide aminé excitateur dont l'activation des récepteurs conduit à l'ouverture du canal calcique associé, ce qui produit une entrée massive du calcium dans l'espace intracellulaire. L'élévation non-contrôlée du calcium intracellulaire et l'activation des nombreuses voies biochimiques qui en résulte, conduisent finalement à la mort neuronale par un mécanisme complexe d'activations enzymatiques en série nommé l'apoptose (mimant la maladie d'Alzheimer). Afin de démontrer le rôle de l'apoD dans ce modèle apoptotique, nous avons comparé les réponses des souris de type sauvage et les souris transgéniques. On a choisi de surexprimer l'apoD humaine chez des souris transgéniques, puisque l'on peut facilement la distinguer de l'apoD endogène de souris. Par ailleurs, le choix de promoteurs dirigés vers les neurones s'appuie sur le fait que les neurones sont le type cellulaire le plus affecté lors de lésions du tissu nerveux. Bien que normalement l'apoD soit produite par les astrocytes et les oligodendrocytes, suite à une atteinte cérébrale aigüe chez les rongeurs, son expression est augmentée dans les astrocytes mais est aussi retrouvée dans les neurones. Dans cette section, les résultats sont discutés dans deux parties : tout d'abord nous avons validé un modèle de neurodégénérescence (induit par l'acide kaïnique) associé à une surexpression de l'apoD et ensuite proposé un rôle protecteur pour l'apoD en prévenant l'apoptose.

4.1 Modèle de neurodégénérescence

Nous avons choisi d'induire la neurodégénérescence chez la souris par l'injection d'acide kaïnique. L'acide kaïnique, un analogue de glutamate qui est un acide aminé excitateur, est souvent utilisé dans les études de la maladie d'Alzheimer et d'épilepsie. Le modèle présenté dans cette étude est basé sur 5 principales caractéristiques des maladies neurodégénératives (Alzheimer) dont nous allons discuter dans les sections 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3 et 4.1.4. Dans la maladie d'Alzheimer, différentes études ont déjà révélé: 1- Une surexpression de l'apoD retrouvée dans le cerveau surtout dans les phases primaires de la maladie (Terrisse *et al.*, 1998). 2- Une surexpression de glutamate et le dysfonctionnement glutamatergique (Greenamyre *et al.*, 1988; Gazulla *et al.*, 2006), 3- Une activation des cellules gliales (Hol EM *et al.*, 2003), 4- Une surexpression de cytokines pro-inflammatoires ainsi que de COX-2 (Pasinetti et Aisen., 1998; Rogers et Lue, 2001), 5- Une perte de milliers de neurones par apoptose surtout dans l'hippocampe (Shimohama, 2000).

4.1.1 L'acide kaïnique induit la surexpression de l'apoD endogène

Une étude a déjà montré la surexpression de l'apoD dans l'hippocampe de rat une semaine après l'injection intra-amygdale de l'acide kaïnique (Montpied *et al.*, 1999). Dans ce projet, nous avons montré la modulation d'expression génique et protéique de l'apoD confirmée par différentes méthodes telles que la RT-PCR semi quantitatif, Northern et Western blot, dans différentes parties du cerveau de souris suite à l'injection intrapéritonéale de l'acide kaïnique. Ainsi nous avons démontré pour la première fois chez la souris que dans l'hippocampe et le cervelet, l'expression de l'apoD survient 3 jours après l'injection de l'acide kaïnique, alors que cette surexpression semble être plus tardive (7 jours) dans le cortex (fig. 3.1, 3.2 et 3.3). Ce retard dans le cortex peut être dû à la concentration la plus élevée des récepteurs GABA dans cette zone. L'acide γ -aminobutyrique (GABA) est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Les propriétés inhibitrices du système nerveux central du GABA sont utilisées dans certains traitements de l'épilepsie. En effet, les récepteurs de GABA sont retrouvés en fortes concentrations dans le cortex et sont associés à la protéine G qui peut être couplée à un canal calcique. Couplée à un canal Ca^{2+} , elle entraîne une diminution des courants calciques et donc, une diminution de la libération du neurotransmetteur excitateur au niveau des terminaisons. Elle provoque aussi

une réduction intracellulaire d'AMP cyclique, ce qui peut conduire à une inhibition temporaire de la libération de neurotransmetteurs excitateurs tel que le glutamate et mener ainsi aux effets tardifs dans le cortex. Cependant il ne faut pas perdre de vue que, après l'injection intrapéritonéale de l'acide kaïnique, près de 1% de la dose injectée seulement passe par la barrière hémato encéphalique. Mais cette petite quantité peut causer la libération de glutamate stocké dans les cellules et ainsi propager davantage ses effets néfastes dans toutes les régions du cerveau. Comme mentionné dans la section 1.13.2, la stimulation des récepteurs de kaïnate cause une entrée massive de Na^+ . L'équilibre ionique est donc rétabli par une entrée passive des ions chlorure, qui fait entrer l'eau dans les cellules par osmolarité et qui cause le gonflement de la cellule et finalement la lyse cellulaire. La rupture de la membrane cellulaire libère dans le milieu le glutamate issu du métabolisme cellulaire; Ce qui augmente davantage le taux de glutamate extracellulaire (McAdoo et al. 2000). C'est une réaction qui sera continuée pendant plusieurs jours et qui affecte davantage toutes les régions du cerveau et cause ainsi la surexpression tardive de l'apoD. En plus, nous avons constaté une diminution de l'expression d'apoD au 7^{ème} jour dans le cervelet et l'hippocampe (fig. 3.3 et 3.1). Cette diminution peut être due à la perte cellulaire induite par les effets toxiques de l'acide kaïnique qui sera étudiée plus tard dans la section 4.1.4. Ces résultats suggèrent ainsi une fonction spécifique pour l'apoD en réponse à l'excitotoxicité de l'acide kaïnique. Cependant, il est possible que la surexpression de l'apoD reflète une réponse non-spécifique à un grand nombre de stimuli différents. Chez les transgéniques, on a obtenu également le même profil ce qui veut dire que l'acide kaïnique provoque une modulation d'expression d'apoD endogène 3 jours après l'injection dans l'hippocampe et le cervelet et 7 jours après l'injection dans le cortex, ce qui est semblable à la réaction chez les souris de type sauvage (fig. 3.1, 3.2 et 3.3). Cette réponse nous permet de conclure que la présence de l'apoD humaine exprimée exclusivement par les neurones chez les transgéniques n'affecte ni l'expression d'ARNm ni la protéine de l'apoD endogène exprimée par les cellules gliales et quelques neurones. Il est à noter que, chez les souris injectées au PBS (contrôles) transgéniques et non-transgéniques, le niveau d'expression d'apoD endogène demeure similaire (fig. 3.1, 3.2 et 3.3).

Nous avons ainsi étudié l'expression de l'apoD en détail dans les différentes parties du cerveau en proposant une courbe de temps suite au traitement à l'acide kaïnique. Vu le peu

d'étude faite dans ce domaine, ces résultats mettent mieux en lumière les différences entre le cerveau de la souris et d'autres rongeurs déjà étudiés dans ce domaine (rat) pour ce qui est de la sensibilité face à un acide aminé exciteur comme l'acide kaïnique ainsi que la sensibilité au sein de différentes parties du cerveau. Nous avons ainsi montré une surexpression de l'apoD endogène induite par l'acide kaïnique tel qu'attendu, ce qui nous permet donc de valider notre modèle.

4.1.2 L'expression de l'apoD est corrélée avec l'expression de GFAP après le traitement à l'acide kaïnique

Une surexpression de GFAP a été observée dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Hol *et al.*, 2003). Le dysfonctionnement glutamatergique joue un rôle important dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer, même si cette perturbation est probablement un phénomène secondaire à d'autres événements neurochimiques, génétiques ou métaboliques, essentiels pour le développement de la maladie. De plus, les plaques séniles présentes dans le cerveau des patients atteints de l'Alzheimer provoquent une entrée massive de Ca^{++} dans la cellule et l'activation des cellules gliales. Même si la GFAP est exprimée par les astrocytes et non par les neurones, sa surexpression est largement utilisée comme un indicateur de dommages et de suractivité neuronale (Steward *et al.*, 1991; O'Callaghan et Jensen, 1992). Afin d'étudier l'activation des astrocytes suite à l'injection de l'acide kaïnique, nous avons mesuré l'expression de la GFAP dans différentes parties du cerveau des souris de type sauvage et transgéniques. Ensuite, en comparant l'expression de GFAP (fig. 3.6) et l'apoD endogène (fig. 3.1, 3.2 et 3.3) dans l'hippocampe, le cortex et le cervelet après le traitement à l'acide kaïnique, on constate que l'augmentation de l'apoD a été concomitante avec l'expression de GFAP chez les 2 groupes de souris. Ainsi l'injection de l'acide kaïnique a provoqué une forte activité neuronale menant à l'expression de l'apoD et la GFAP par les astrocytes. Les stéroïdes sexuels produits par les astrocytes sont potentiellement responsables de l'augmentation locale de l'ARNm d'apoD et de sa protéine soit en activant directement l'expression du gène ou indirectement, en causant un arrêt de croissance des astrocytes. L'apoD, telle que produite par les astrocytes peut participer aux effets bénéfiques des stéroïdes, en les redistribuant aux neurones (Garcia-Segura *et al.* 1999).

Comme on le voit sur la figure 3.6, l'expression de GFAP chez les souris de type sauvage est presque similaire à celle chez les transgéniques, indiquant qu'un excès d'apoD humaine (exprimée par les neurones) ne peut pas réduire le niveau d'activité des astrocytes de façon significative. Il est à noter que chez les souris injectées au PBS (contrôles) transgéniques et non-transgéniques, le niveau d'expression de GFAP demeure similaire.

4.1.3 L'acide kaïnique induit l'expression de COX-2

La cyclooxygénase-2 (COX-2) exprimée par les cellules gliales, catalyse la première étape dans le métabolisme de l'acide arachidonique non-estérifié aux prostaglandines (PG) et thromboxanes (TX) (Smith et al. 2000). Il a été démontré que cette voie métabolique joue un rôle important dans les processus physiologiques, tel que la transmission synaptique, la libération de neurotransmetteurs et la régulation de la circulation sanguine cérébrale ainsi que dans les troubles neurologiques et les maladies neurodégénératives, comme les accidents vasculaires cérébraux, l'épilepsie et la maladie d'Alzheimer.

Nos résultats obtenus par RT-PCR (fig. 3.7 à gauche) révèlent que l'injection de 15mg d'acide kaïnique ne provoque pas la transcription du gène de COX-2 chez toutes les souris injectées. Ainsi, la présence de COX-2 a été retrouvée seulement dans l'hippocampe et le cortex des souris ayant de très fortes convulsions (tabl. I et tableau supplémentaire II) et elle a été totalement absente dans le cervelet des mêmes souris. Il a été démontré que l'inhibition pharmacologique ou la suppression génétique de COX-2, mais pas celle de la COX-1 augmente la sensibilité à l'acide kaïnique et il y a une relation directe entre l'augmentation des prostaglandines et les crises épileptiques qui coïncident avec la manifestation des dommages neuronaux (Toscano *et al.*, 2008). Donc, on peut conclure que l'injection de l'acide kaïnique a provoqué des convulsions chez les souris ce qui a déclenché l'expression de COX-2 et la production des prostaglandines. Cependant, en augmentant la dose de l'acide kaïnique à 20mg, la présence de COX-2 devient ubiquitaire dans tout le cerveau des souris ayant de fortes réponses épileptiques et on la détecte même dans le cervelet (fig. 3.7 à gauche). Ce résultat suggère qu'une faible dose d'acide kaïnique (15mg) n'est pas suffisante pour déclencher l'inflammation ainsi que l'expression du COX-2 dans toutes les régions du cerveau, alors qu'avec la même dose, nous avons obtenu un taux élevé des cellules apoptotiques (fig. 3.8, 3.9 et 3.10) dans toutes les régions du cerveau (hippocampe, cortex et

cervelet) et chez toutes les souris traitées. Ceci confirme les études précédentes suggérant l'acide kaïnique plus comme un agent apoptotique.

En ce qui concerne les transgéniques, l'expression de COX-2 semble être moins forte par rapport aux souris de type sauvage exprimant cette enzyme, mais qui est seulement présent dans l'hippocampe et le cortex des souris montrant des crises épileptiques très fortes (fig. 3.7 à droite). Plusieurs études ont déjà montré que le facteur de transcription nucléaire kappa B (NFkB) peut moduler directement l'expression de COX-2 (Lee *et al.*, 2004). Plus intéressant encore, on retrouve au niveau de promoteur d'apoD humaine, un élément NFkB impliqué dans la réponse au lipopolysaccharide (Do Carmo *et al.*, 2007), ce qui peut suggérer un rôle pour l'apoD en modulant COX-2 via NFkB. Aussi, une étude récente a montré que l'apoD en se liant à l'acide arachidonique, empêche son oxydation en produits neurotoxiques tel que les prostaglandines (He *et al.*, 2009). Donc, il est possible que l'apoD supplémentaire chez les transgéniques puisse séquestrer plus d'acide arachidonique et donc inhiber indirectement l'expression des enzymes ayant la capacité de convertir l'acide arachidonique en prostaglandines, ce qui pourrait contribuer à une plus faible expression de COX-2 chez les transgéniques. Il est à noter que chez les souris injectées au PBS (contrôles) transgéniques et non-transgéniques, le niveau d'expression de COX-2 demeure similaire et indétectable.

4.1.4 L'acide kaïnique induit l'apoptose dans le cerveau des souris

L'acide kaïnique, un analogue de glutamate est également un exemple typique d'une excitotoxine du cerveau. Ainsi le glutamate est paradoxalement le neurotransmetteur excitatoire principal dans le SNC mammifère. Dans les conditions normales, la concentration de glutamate peut être augmentée jusqu'à 1 millimètre dans la fissure synaptique, qui est rapidement diminuée dans un délai de millisecondes. Quand la concentration en glutamate dans la fissure synaptique demeure élevée, le neurone meurt par un processus appelé apoptose. L'excitotoxicité est le processus pathologique par lequel des cellules nerveuses sont endommagées et tuées par le glutamate et les substances semblables. Le niveau élevé de glutamate ou la présence de kaïnate, peut causer l'excitotoxicité en augmentant l'ion de Ca^{2+} intracellulaire, ce qui active un certain nombre d'enzymes, y compris les ribonucléases, les phospholipases et les protéases telles que la Calpaïne. Ces enzymes continuent d'endommager des structures cellulaires telles que des composantes du cytosquelette, de la

membrane, des mitochondries et de l'ADN. L'excitotoxicité est impliquée dans les maladies neurodégénératives du système nerveux central telles que : la sclérose en plaques, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington, des maladies où une augmentation de l'apoD a été constatée (Terrisse *et al.*, 1998; Dandoy *et al.*, 1998; Reindl *et al.*, 2001; Ordonez *et al.*, 2006). Au cours de la maladie d'Alzheimer, la perte neuronale déclenchée par l'apoptose est importante puisqu'elle peut toucher jusqu'à 50 % des neurones dans certaines aires cérébrales. Ceci conduit à une atrophie cérébrale chez le malade.

En se référant aux résultats obtenus par TUNEL (fig 3.8, 3.9 et 3.10), il est évident que l'acide kaïnique induit une forte apoptose dans différentes parties du cerveau des souris injectées, surtout dans les zones CA1 et CA3 de l'hippocampe. L'hippocampe (la région la plus endommagée dans la maladie d'Alzheimer) est la partie la plus sensible face à l'acide kaïnique ; la concentration élevée des récepteurs de kaïnate peut expliquer la vulnérabilité de cette zone. Ces résultats permettent de conclure que l'injection de 15mg d'acide kaïnique provoque l'apoptose dans le cortex, le cervelet et l'hippocampe des souris, aux 3^{ème} et 7^{ème} jours. Cependant, puisque le test TUNEL est considéré comme une méthode qualitative et pas quantitative, il est impossible de comparer l'apoptose aux 3^{ème} et 7^{ème} jours. Pour cela, on pourrait mesurer une des enzymes impliquées dans le processus d'apoptose telle que la caspase-3. Nous avons essayé un anticorps anti-caspase-3 sur les extraits protéiques des cerveaux par un transfert de type western, mais le test n'a pas été positif, probablement en raison d'inefficacité de l'anticorps utilisé pour détecter la caspase-3 *clivée*. Les caspases sont présentes dans le cytoplasme des cellules normales, sous forme de proenzymes inactives et non-clivées appelés procaspases. Suite à l'apoptose, ces procaspases vont être clivées et dans certains cas, dimérisées pour former les caspases actives. Les caspases activées vont pouvoir à leur tour activer d'autres procaspases et ainsi développer une activation en cascade et développer l'apoptose. Donc, pour avoir une mesure exacte de l'apoptose, il faudra chercher la caspase déjà clivée et activée.

Ces résultats peuvent suggérer aussi que 15mg d'acide kaïnique a provoqué un taux élevé de cellules apoptotiques dans toutes les parties du cerveau ainsi que chez toutes les souris injectées alors que cette dose n'a pas provoqué l'expression de COX-2 (fig. 3.7) chez toutes les souris ni dans toutes les régions du cerveau. Cela confirme une fois de plus le rôle

de l'acide kaïnique comme un agent apoptotique et que, pour induire l'inflammation par l'acide kaïnique, il faudra augmenter la dose comme c'est montré dans la figure 3.7 avec 20mg d'acide kaïnique. Cependant, il ne faut pas perdre de vue que l'apoptose et l'inflammation sont étroitement liées et que, bien que l'un des aspects semble l'évènement majeur d'un stress, l'autre est toujours présent.

4.2 La modulation d'apoptose par l'apoD chez les souris transgéniques

Le test TUNEL dans le cerveau a permis de démontrer une diminution d'au moins 30% d'apoptose dans le cerveau des souris transgéniques. Ces résultats sont fort encourageants car, en comparant le cerveau entier d'une souris transgénique et celui d'une souris de type sauvage ayant le même âge et dans les mêmes conditions, suite au traitement à l'acide kaïnique, l'apoptose semble être moins intense chez la transgénique bénéficiant d'apoD supplémentaire (fig. 3.11). Ceci suggère également que l'apoptose semble être le paramètre montrant le plus de différences entre les transgéniques et les non-transgéniques suite à l'injection de l'acide kaïnique. Ainsi l'apoD pourrait jouer un rôle en prévenant l'apoptose. On peut donc présumer que l'augmentation d'apoD dans les neurones, telle qu'induite par le transgène, pourrait faciliter le transport des stéroïdes et des œstrogènes en particulier entre les cellules et conférer ainsi une plus grande neuroprotection. Une étude sur l'apoptose induite par le glutamate chez les neurones suggère que l'œstrogène inhibe l'apoptose en prévenant l'activité des protéases telles que la calpaïne (Zhang *et al.*, 2006). Étant donné que l'apoD est reconnue comme un ligand pour l'œstrogène, l'excès de l'apoD chez les transgéniques peut jouer un rôle en transférant l'œstrogène aux neurones en dégénérescence et ainsi jouer un rôle en inhibant les protéases et finalement bloquer l'apoptose. Il a été montré que l'activation des récepteurs de kaïnate dans l'hippocampe induit l'apoptose via l'activation de voie ERK (*extracellular receptor kinases*), JNK et p38-kinase (Mukherjee *et al.*, 1999). Il a été également suggéré qu'en bloquant la JNK, l'expression d'apoD serait inhibée; Ceci indique que l'apoD est régulée par cette voie apoptique (Bajo-Graneras *et al.*, 2006) et peut suggérer ainsi une autre raison pour la diminution d'apoptose chez les transgéniques bénéficiant d'un excès de l'apoD.

Cependant, un point intéressant serait de comparer la quantité totale d'apoD (apoD humaine + apoD de souris induite par l'acide kaïnique) versus la quantité d'apoD chez les

souris non-transgéniques (apoD de souris seulement) suite au traitement à l'acide kaïnique, afin d'évaluer la quantité d'apoD jouant un rôle en apoptose par rapport aux souris de type sauvage privées de cette protection. Pour cela il faudra produire un anticorps ayant la capacité de reconnaître les deux protéines (apoD de souris et apoD humaine) et ensuite les comparer.

4.3 Réponses épileptiques et le changement de poids chez les transgéniques et les souris de type sauvage

Selon l'étude comportementale faite pendant 2 heures suivant l'injection de 15mg d'acide kaïnique (tableau I et tableau supplémentaire II), des crises épileptiques répétitives ont été enregistrées chez les deux groupes de souris. Cependant, une légère différence dans le taux et la gravité des convulsions chez les transgéniques surexprimant l'apoD est observable. Au niveau de changement du poids, les souris de type sauvage traitées au kaïnate perdent du poids durant une semaine, alors que les transgéniques récupèrent mieux durant la semaine post-injection. Donc, on peut conclure que les transgéniques semblent mieux résister aux effets de l'acide kaïnique et récupèrent dans un laps de temps plus court par rapport aux souris de type sauvage.

4.4 L'expression d'apoD humaine reste intacte même après le traitement à l'acide kaïnique

Afin de comprendre le rôle de l'apoD, des souris transgéniques surexprimant l'apoD humaine sont produites en utilisant l'ADNc de l'apoD humaine mis sous contrôle du promoteur de Thy-1 humain. Il faut rappeler que l'apoD de souris est à 80 % identique à l'apoD chez l'humain. Étant donné le choix du promoteur, l'apoD humaine (transgène) est exprimée par les neurones chez les transgéniques alors que l'apoD souris (endogène) est exprimée par les cellules gliales, mais elle a été retrouvée également dans quelques neurones suite à un stress. De plus, bien que la structure du gène et ses sites majeurs d'expression soient différents, on pense que la fonction est semblable chez les deux espèces.

Selon le résultat obtenu et montré dans la figure 3.5, la présence de l'apoD humaine transgène n'affecte ni l'expression d'ARNm de l'apoD souris endogène ni le niveau de sa protéine en réponse au traitement à l'acide kaïnique. Cependant, cette apoD supplémentaire est supposée secourir l'apoD endogène chez les transgéniques, tel que déjà montré face au

stress oxydatif et à l'inflammation (DoCarmo *et al.*, 2008; Ganfornina *et al.* 2008). Il est à mentionner que le niveau d'expression d'apoD humaine reste stable avant et après le traitement à l'acide kaïnique, ce qui permet de conclure que le promoteur Thy-1 n'est pas modulé par l'acide kaïnique.

CHAPITRE V

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet ont permis d'établir tout d'abord un modèle de neurodégénérescence associé à une surexpression de l'apoD chez la souris et ensuite proposer un rôle pour l'apoD notamment dans la prévention de l'apoptose. Nous avons induit la neurodégénérescence en injectant l'acide kaïnique de façon intrapéritonéale chez les souris. L'acide kaïnique (analogue du glutamate) est un acide aminé excitateur dont l'activation des récepteurs dans le cerveau cause la dépolarisation des neurones et finalement la mort neuronale par apoptose. Différents aspects communs entre les maladies neurodégénératives et le modèle présenté dans cette étude ont été rétablis. Les souris traitées par l'acide kaïnique dans cette étude permettent d'élaborer les mécanismes en cause dans l'exicotoxicité impliquée dans les maladies neurodégénératives dont l'Alzheimer. Nous avons montré pour la première fois chez la souris, la surexpression génique et protéique de l'apoD suite au traitement à l'acide kaïnique, dans différentes parties du cerveau. Ces données suggèrent un rôle pour l'apoD en situation de stress provoqué par l'acide kaïnique. Nous avons ainsi établi une corrélation entre l'activité des cellules gliales et la surexpression de l'apoD induite par l'acide kaïnique. Nous avons démontré que l'acide kaïnique induit la surexpression de la GFAP qui est aussi manifesté dans plusieurs neuropathologies. Les résultats obtenus par le test TUNEL ainsi que l'expression du facteur inflammatoire COX-2 suggèrent l'apoptose comme événement majeur dans le stress induit par l'acide kaïnique.

Le deuxième volet de notre projet consistait à déterminer si l'augmentation de l'expression de l'apoD est bénéfique pour la survie des cellules neuronales. Pour ce faire, nous avons étudié la neurodégénérescence induite par l'acide kaïnique chez des souris transgéniques surexprimant l'apoD humaine dont la fonction est comparable à celle de la

souris. Nous avons opté pour la surexpression de l'apoD humaine afin de pouvoir la distinguer de l'apoD endogène de souris. Notre équipe a choisi d'exprimer l'apoD humaine sous le contrôle du promoteur Thy-1 qui est spécifique des cellules neuronales. Les souris transgéniques présentent une meilleure résistance au niveau des réponses épileptiques ainsi qu'une inhibition de la perte de poids suite au traitement à l'acide kaïnique. Le test TUNEL dans le cerveau a permis aussi de démontrer une diminution d'au moins 30% de l'apoptose dans le cerveau des transgéniques bénéficiant d'apoD supplémentaire. Nous avons suggéré également que l'apoptose semble être le paramètre montrant le plus de différences entre les transgéniques et les non-transgéniques suite à l'injection de l'acide kaïnique. Ainsi l'apoD pourrait jouer un rôle neuroprotecteur en prévenant l'apoptose. On peut présumer que l'augmentation d'apoD dans les neurones, telle qu'induite par le transgène, pourrait faciliter le transport des stéroïdes et des œstrogènes en particulier entre les cellules et conférer ainsi une plus grande neuroprotection. Elle pourrait aussi capturer l'acide arachidonique libre ou des lipides dans le cytoplasme, empêchant leur utilisation dans des réactions enzymatiques ou autres voies nuisibles pour la cellule. Elle pourrait également participer à l'élimination de métabolites toxiques et à l'apport de nutriments ou de facteurs nécessaires à la réparation. L'ensemble des travaux présentés dans ce projet de maîtrise mettent plus en lumière l'implication de l'apoD dans le processus apoptotique induit par des agents excitatoires. Il souligne ainsi l'importance de la compréhension des mécanismes moléculaires contrôlant l'expression de l'apoD, afin de l'utiliser comme cible thérapeutique de premier choix dans les maladies neurodégénératives. Certes, des études plus poussées seront nécessaires pour mieux définir les mécanismes par lesquelles l'apoD pourrait prévenir l'apoptose ainsi qu'à quelle étape d'un processus apoptotique, elle pourrait intervenir.

- Afin d'élucider quelques aspects de la fonction de l'apoD dans le processus d'apoptose induit par l'acide kaïnique, il serait intéressant de mesurer différentes molécules pro-apoptotique ou anti-apoptotique telles que Bax (*Bcl-2-associated X protein*) et Bcl-2 (*B-cell CLL/lymphoma 2*) et les comparer chez les transgéniques et les non-transgéniques.

- Bien que la NFkB soit omniprésente dans toutes les cellules, son rôle dans les neurones du système nerveux central est controversé. Plusieurs études ont affirmé que le facteur de

transcription est soit constitutivement actif dans les neurones ou activé par des acides aminés neurotransmetteurs excitateurs ou les deux. NFkB peut réguler des gènes anti-apoptotiques tels que TRAF1 et TRAF2 (*Tumor necrosis Receptor-Associated Factor*) et donc l'activité des enzymes de la famille des caspases qui sont au cœur de la plupart des processus apoptotiques. Étant donné l'élément NFkB retrouvé sur le gène d'apoD, il semble judicieux de tester la modulation de NFkB ainsi que TNF α (*Tumor Necrosis Factor- α*) chez les transgéniques avant et après l'injection de l'acide kaïnique tout en les comparant avec les non-transgéniques.

- Les tests d'immunohistochimie à l'aide de marqueurs d'inflammation et d'apoptose dans différentes parties du cerveau seraient forts intéressants. Il est aussi envisageable de regarder la co-expression de différents facteurs avec l'apoD murine ou l'apoD humaine dans différents types cellulaires avant et après le traitement à l'acide kaïnique. Une comparaison pourrait aussi être faite entre les niveaux de protéine d'apoD humaine et d'apoD de souris endogène en situation normale, ainsi qu'après le traitement à l'acide kaïnique dans différents types cellulaires.

- Puisque l'hippocampe est fortement ciblé par l'acide kaïnique, il serait intéressant de faire un test de mémoire et comparer la capacité d'apprentissage et la mémorisation des souris de type sauvage et les transgéniques. La piscine de Morris est le test le plus couramment employé pour évaluer les capacités de mémoire et d'apprentissage de souris transgéniques et les souris de type sauvage. La tâche consiste pour l'animal à localiser, à l'aide des indices distaux, une plate-forme ou un refuge invisible par immersion dans un bassin rempli d'eau opacifiée. Suivant le protocole utilisé, le dispositif permet d'évaluer la mémoire de référence (la plate-forme change de place à chaque jour de test) ou la mémoire de travail (la plate-forme change de place d'un jour à l'autre). L'automatisation du système permet d'évaluer le temps de latence pour atteindre la cible/plate-forme, le temps de présence et distance parcourue dans chacun des quadrants, la distance totale parcourue.

- L'apoD peut également jouer son rôle de neuroprotection en transportant les stéroïdes, en particulier les oestrogènes qui jouent un rôle important dans la fonction neuronale et dans la protection des neurones en situations pathologiques. Ainsi, on peut quantifier les stéroïdes

(par des méthodes comme ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*) suite au traitement à l'acide kaïnique chez les souris transgéniques et les comparer avec les non-transgéniques.

- Les plaques séniles essentiellement localisées dans le cortex et l'hippocampe des patient atteints de l'Alzheimer, correspondent à l'accumulation extracellulaire d'un peptide dit β -amyloïde. Cette anomalie est liée avec une entrée anormale de calcium dans le neurone, ce qui activerait la microglie (réaction inflammatoire), entraînant la mort inéluctable du neurone par apoptose. Des études précédentes ont révélé l'accumulation d'apoD autour des plaques séniles surtout dans les phases primaires de la maladie. Il serait donc intéressant de vérifier la présence des plaques séniles dans le cerveau des souris de type sauvage injectées à l'acide kaïnique et les comparer avec les souris transgéniques. Afin de visualiser les plaques on peut se servir des méthodes histologiques ainsi que la coloration au nitrate d'argent.

- L'examen de l'expression de l'apoD de souris, la GFAP et le COX-2 à des jours subséquents (après 7 jours) suite à l'injection de l'acide kaïnique, notamment dans le cortex des souris étant donné les effets tardifs de l'acide kaïnique dans cette zone. Aussi, il faudrait mesurer la GFAP et la COX-2 au niveau de la protéine et surtout confirmer ces réponses chez les transgéniques en augmentant le nombre des souris.

- Il serait aussi intéressant de regarder les ROS (*Reactive oxygen species*), l'expression de la protéine tau, du β -amyloïde, de cytokines ainsi que les protéines du complément provoqués suite au traitement à l'acide kaïnique chez les souris de type sauvage et les transgéniques.

CHAPITRE VI

RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES

6.1 Injection de 15mg d'acide kaïnique

Le tableau supplémentaire II révèle brièvement le registre obtenu en observant les souris montrant des comportements épileptiques. Par exemple : chez la souris de type sauvage numéro 1 (Wt1), le comportement épileptique a débuté 21 minutes et 20 secondes après l'injection de 15mg d'acide kaïnique; il s'agissait d'une convulsion unilatérale qui a duré environ 6 secondes; aucune convulsion bilatérale ni full clonic-tonic n'a été détectée. Chez la deuxième souris (Wt2), la première convulsion a débuté 26 minutes et 20 secondes après l'injection; il s'agissait d'une convulsion du 3^{ème} degré (bilatérale) qui a duré environ 23 secondes et qui, 8 secondes plus tard, a été suivie par une seconde convulsion full clonic-tonic d'une durée de 17 secondes. Ce qui fait en somme 2 convulsions pour une durée totale de 40 secondes. Quant à la souris transgénique numéro 1 (Tg1), la première convulsion a débuté 8 minutes et 40 secondes après l'injection; il s'agissait d'une convulsion du premier degré (mouvement de tête); elle a duré environ 10 secondes et aucune convulsion de 2^{ème}, 3^{ème} ou 4^{ème} degré n'a été détectée chez cette souris. Et ainsi de suite pour le reste des transgéniques. Il semble que l'injection de 15mg d'acide kaïnique induit des convulsions dans un laps de temps plus court chez les transgéniques, mais en étudiant les écarts types de plus près, on constate que les différences ne sont pas significatives. Cependant, 2 souris non-transgéniques sur 8 et 1 transgénique sur 7 n'ont pas eu de convulsions du tout. L'unique différence significative réside dans le nombre de convulsion unilatérale et full clonic-tonic qui est de zéro chez les transgéniques, de 0,125 et 0,75 (les cadres colorés) respectivement chez les non-transgéniques.

Tableau supplémentaire II
Étude de comportement (15mg de KA)

souris	temps de latence	nombre des convulsions	moyenne de temps entre les convulsions	durée totale des convulsions	2ème degré	3ème degré	4ème degré
Wt1	21 '20''	1	0'	6''	1	0	0
Wt2	26 '20''	2	8'	40''	0	1	1
Wt3	20'	5	13,5'	6'	0	1	2
Wt4	12'	1	0	7''	0	0	0
Wt5	0	0	0	0	0	0	0
Wt6	14'	4	7,5'	2'	1	2	2
Wt7	15'	10	11,5'	6'	0	3	1
Wt8	0	0	0	0	0	0	0
moyenne	14'	2,87	5,06'	2,04'	0,125	0,875	0,75
¹ SD	8,43	3,45	5,73	2,7	0,38	1,15	0,9
² SEM	3,19	1,3	2,03	1,98	0,14	0,44	0,34
Tg1	8 '40''	1	0	10''	0	0	0
Tg2	23 '20''	1	0	10''	0	0	0
Tg3	10'	3	12,5'	13'	0	1	0
Tg4	11'	2	20'	10'	0	0	0
Tg5	12'	3	16,5'	15'	0	0	0
Tg6	45'	1	0	4'	0	0	0
Tg7	0	0	0	0	0	0	0
moyenne	16'	1,57	7'	2,045'	0	0,14	0
¹ SD	14,62	1,19	8,9	5,05	-	0,35	-
² SEM	5,17	0,42	3,4	2,64	-	0,13	-

¹SD (standard deviation) = écart type

²SEM (standard error of the median) = erreur standard de la moyenne

6.2 Injection de 20mg d'acide kaïnique

Suite à l'injection de 20 mg de kaïnate, on constate des convulsions très fortes et de très longue durée. Pour respecter les normes du CIPA (le Comité institutionnel de protection des animaux de l'UQAM), nous avons sacrifié les souris ayant des convulsions pendant plus de 2h. Pour cause de taux de mortalité élevé (plus de 75% après l'injection de 20 mg d'acide kaïnique) et d'un grand nombre de sacrifices, l'expérience fut arrêtée pour 20 mg. À première

constatation, il pourrait être envisageable que les convulsions commencent avec plus de retard chez les transgéniques, cependant le nombre des souris utilisé étant insuffisant, il était impossible d'avoir une conclusion ferme. Ces résultats ont été mentionnés afin de montrer la raison pour laquelle nous avons continué notre étude avec 15 mg de KA.

Tableau supplémentaire III
Étude de comportement (20mg KA)

Souris	Temps de latence	Nombre de convulsion	Moyenne de temps entre les convulsions	Durée totale des convulsions	2ème degré	3ème degré	4ème degré	Mortalité
Wt1	2'	1	0	10''	0	0	0	-
Wt2	27'20''	9	12,30''	>2h	0	7	1	³ Euth
Wt3	11'50''	9	9'	>2h	4	7	3	³ Euth
Wt4	7'32''	3	3'30''	>2h	2	3	1	Mort
¹Moy	12'15''	5,5	6'37''	-	1,5	4,25	1,25	-
²SEM	5,42	2	2,76	-	0,96	1,7	0,63	-

Tg1	4'	13	3'30''	>2h	2	6	5	³ Euth
Tg2	15'33''	1	0	8''	0	1	0	-
Tg3	7'10''	3	17'20''	>2h	1	1	0	Mort
¹Moy	9'6''	6'07''	7'13''	-	1	2,6	1,6	-
²SEM	3,38	3,71	5,27	-	0,58	1,67	1,67	-

¹ Moy = moyenne

² SEM (standard error of the median) = erreur standard de la moyenne

³ Euth = euthanasié

BIBLIOGRAPHIE

- Alaupovic P, Sanchez EJ and McConathy WJ. 1981. Plasma apolipoprotein concentration in familial apolipoprotein A-I and A-II deficiency (Tangier disease). *Metabolism* 30(8): 805-9
- Albers JJ, Adolphson J and Chen CH. 1985. Defective enzyme causes lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency in a Japanese kindred. *Biochim Biophys Acta* 835(2): 253-7
- Albers JJ, Cheung MC, Ewens SL, Tollefson JH. 1981. Characterization and immunoassay of apolipoprotein D. *Atherosclerosis* 39: 395-409
- Aspinall JO, Bentel JM, Horsfall DJ, Haangensen DE, Marshal VR, Tilley WD. 1995. Differential expression of apolipoprotein D and prostate specific antigen in benign and malignant prostate tissues. *J Urol* 154: 622-628
- Bajo-Graneras R, Crespo-Sanjuan J, Perez-Carbajales C, Ordonez-Rgil Cambor C, Sanchez D, Ganfornina MD. 2006. Characterization and identification of ApoD activation network in Astrocytes subjected to oxidative stress. (Congrés) *Acta Physiologica* 651: P23
- Baker WA, Hitman GA, Hawrami K, McCarthy MI, Riikonen A, Tuomilehto-wolf E, Nissinen A, Tuomilehto J, Mohan V, Vswanathan M, et al. 1994. Apolipoprotein D gene polymorphism: a new genetic marker for type 2 diabetic subjects in Nauru and south India. *Diabet Med* 11(10):947-52
- Balbin M, Freije JM, Fueyo A, Sanchez L, Lopez-Otin C. 1990. Apolipoprotein D is the major protein component in cyst from woman with human breast cystic disease. *Biochem. J.* 271: 803-807.
- Baran H, Lassmann H, Sperk G. 1988. Behavior and neurochemical changes 6 months after kainic acid. *Neurosci, Abstr.* 14, 472
- Baris O, Savagner F, Nasser V, Lloriod B, Granjeaud S, Guyetant S, Franc B, Rodien P, Rohmer V, Bertucci F, Birnbaum D, Malthiery Y, Reynier P and Houlgatte R. 2004. Transcriptional Profiling Reveals Coordinated Up-Regulation of Oxidative Metabolism Genes in Thyroid Oncocytic Tumors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* Vol. 89, No. 2 994-1005
- Bazan NG, Colangelo V, Lukiw WJ. 2002. Prostaglandins and other lipid mediator in Alzheimer's disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69: 197-210
- Behl C. 1997. Amyloid beta-protein toxicity and oxidative stress in Alzheimer's disease. *Cell Tissue Res.* 290(3):471-80. Review
- Ben-Ari Y., Tremblay E. and Ottersen O.P and Meldrum, B.S. 1980b. The role of epileptic activity in hippocampal and "remote" cerebral lesions induced by kainic acid. *Brain Res.* 2;191(1):79-97
- Ben-Ari Y., Tremblay E. and Ottersen, O.P. 1980a. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience.* 5(3):515-28.

Ben-Ari Y., Tremblay E. and Ottersen O.P and Meldrum, B.S. 1980b. The role of epileptic activity in hippocampal and "remote" cerebral lesions induced by kainic acid. *Brain Res.* 2;191(1):79-97

Ben-Ari Y., Tremblay E. and Ottersen, O.P.1980a.Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. *Neuroscience.* 5(3):515-28.

Ben-Ari Y.1985.Limbic seizure and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.*14 (2):375-403. Review.

Berger ML, Lefauconnier JM, Tremblay E, Ben-Ari Y.1986.Limbic seizures induced by systemically applied kainic acid: how much kainic acid reaches the brain? *Adv Exp Med Biol* 203:199-209.

Bhawan and Meera Mahalingam.2007. Apolipoprotein d in CD34-Positive and CD34-negative cutaneous neoplasms: a useful marker in differentiating superficial acral fobromyxoma from dermatofibrosarcoma protuberans. *Modern Pathology* 21, 31–38; doi:10.1038/modpathol.3800971

Bishop RE.2000. The bacterial lipocalins. *Biochim Biopys Acta* 1482: 73-83

Blais Y, Sugimoto K, Carriere MC, Haagensen DE, Labrie F, Simard J. 1995. Interleukin-6 inhibits the potent stimulatory action of androgens, glucocorticoids and interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and GCDFP-15 expression in human breast cancer cells. *Int J Cancer cells.* *Int J Cancer* 62: 732-737

Blais Y, Sugimoto K, Carrire MC, Haagensen DE, Labrie F, Simard J. 1994. Potent stimulatory effet of interleukin-1 alpha on apolipoprotein D and gross cystic disease fluid protein-15 expression in human breast-cancer cells, *Int J Cancer* 59: 400-407

Blanco-Vaca F, Via DP, Yang CY, Massey JB, Pownall HJ.1992. Characterization of disulfide-linked heterodimers containing apolipoprotein D in human plasma lipoprotein. *Jlipid Res* 33: 1785-1796

Boguski MS. 1992. Computational sequence analyse revisited: new databases, software tools, and the research opportunities they engender. *J Lipid Res* 33: 957-974

Boyles, J.K., L.M.Notterpek, M.R.Wardell, S.C.Rall, Jr .1991. Identification, characterization, and tissue distribution of apolipoprotein D in the rat. *J. Lipid Res* 31: 2243-2256

Boyles.J.K, .Netterpek.L.M, Anderson.L. 1990. Accumulation of Apolipoproteins in the Regenerating and Remyelinating Mammalian Peripheral Nerve. *Biological chemistry.* 17805-17815

Camato EJ, Lyster DM, Israels S. 1975. Analbuminemia in a neonate. *J Pediatr* 86: 862-867

Cavalheiro EA, Calderazzo Filho LS, Riche D, Feldblum S, Le Gal La Salle G. 1983. Amygdaloid lesion increases the toxicity of intrahippocampal kainic acid injection and reduces the late occurrence of spontaneous recurrent seizures in rats. *Brain Res* 262(2):201-7

Charron JB., Ouellet F., Houde M. and Sarhan F. 2005. The plant Apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC Plant Biol.* 31; 8:86
Coyle J.T., Schwarcz R. 1976. Model for Huntington's chorea : lesion of striatal neurons with kainic acid, *Nature* 263 244-246

Dandoy-Dron F, Guillo f, Benboudjema L, Deslys JP, Lasmezas C, Dormont D, Tovey MG, Dron M. 1998. Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts. *J Biol Chem* 273: 7691-7697

del Valle E., Navarro A., Astudillo A. and Tolivia J. 2003. Apolipoprotein D expression in human brain reactive astrocytes. *J Histochem Cytochem.* 51(10):1285-90

Desai PP, Hendrie HC, Evans RM, Murrell JR, DeKosky ST, Kamboh MI. 2003. Genetic variation in apolipoprotein D affects the risk of Alzheimer disease in African-Americans. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 1; 116B (1):98-101.

DeWan AT, Arnett DK, Atwood LD, Province MA, Lewis CE, Hunt SC, Eckfeldt J. 2001. A genome scan for renal function among hypertensives: the HyperGEN study. *Am J Hum Genet* 68(1): 136-144

DeWan.A.T, Arnett.D.K, Atwood.L.D, Province.M.A, Lewis.C.E, Hunt.S.C, and Eckfeldt.J. 2001. A genome scan for renal function among hypertensives: the HyperGEN study. *Am J Hum Genet* 68(1): 136-144

Dieplinger.H, Schoenfeld.P.Y, Fielding.C.J .1986. Plasma cholesterol metabolism in end-stage renal disease. Difference between treatment by hemodialysis or peritoneal dialysis. *J Clin Invest.* 77(4): 1071-1083

Djebaili.M, De Bock.F, Baille.V, Bockaert.J and Rondouin.G .2002. Implication of p53 and caspase-3 in kainic acid NOT in n methyl aspartic acid induced apoptosis in organotypic hippocampal mouse. *Neuroscience Letters* 3271-4

Do Carmo S, Seguin D, Milne R, and Rassart E. 2002. Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E mRNA expression by growth arrest and identification of key elements in the promoter. *J Biol Chem* 277: 5514-5523

Do Carmo S., Levros Jr.L.C. and Rassart.E.2007. Modulation of apolipoprotein, expression and translocation under specific stress conditions. *Biochemical et Biophysical Acta* 1773: 954-969

Do Carmo S., Jacomy H., Talbot P.and Rassart E. 2008. Neuroprotective Effect of Apolipoprotein D against Human Coronavirus OC43-Induced Encephalitis in Mice. *The Journal of Neuroscience*. 28(41):10330-10338

Do Carmo S., Fournier. D, Mounier C. and Rassart E. 2009. Human apolipoprotein D overexpression in transgenic mice induces insulin resistance and alters lipid metabolism. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 296(4):E802-11

Drayna D,Fielding C, Mclean J, BaerB, Castro G, Chen E, Comstock L, Henzel W, Kohr W, Rhee L, Wion K, Lawn R. 1986. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *LBiol Chem* 261: 16535-16539

Drayna DT, Mclean JW, Wion KL, Trent JM, Drabkin HA, Lawn RM.1987. Human Apolipoprotein D gene: gene sequence, chromosome localization, and homology to the alpha2u-globulin superfamily. *DNA* 6: 199-204

Fielding PE, Fielding CJ. 1980. A cholesteryl ester transfer complex in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 3327-3330

Flatscher-Bader T, Wilce PA. 2006. Chronic smoking and alcoholism change expression of selective genes in the human prefrontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res*. 30(5):908-15.

Flood JF, Morley JE, Roberts E. 1992. Memory-enhancing effects in male mice of pregnenolone and steroids metabolically derived from it. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1567-1571

Floyed RA, Hensley K.2002. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative disease. *Neurobiol Aging* 23: 795-807

Franz G, Reindl M, Patel SC, Beer R, Unterrichter I, Berger T, Schmutzhard E, Poewe W, Kampfl A. 1999. Increased expression of apolipoprotein D following experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 73: 1615-1625

Ganfornina MD, Do Carmo S, Lora JM, Torres-Schumann S, Vogel M, Allhorn M, González C, Bastiani MJ, Rassart E, and Sanchez D. 2008. Apolipoprotein D is involved in the mechanisms regulating protection from oxidative stress. *Aging Cell*. 7(4):506-15.

Garcia-Segura LM, Naftolin F, Hutchison JB, Azcoitia I, Chowen JA. 1999. Role of astroglia in estrogen regulation of synaptic plasticity and brain repair. *Neurobiol*. 40(4):574-84. Review.

Gazulla J, Cavero-Nagore M. 2006. Glutamate and Alzheimer's disease. *Rev Neurol.* 1-15; 42(7):427-32. Review.

Greenamyre JT, Maragos WF, Albin RL, Penney JB, Young AB. 1988. Glutamate transmission and toxicity in Alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 12(4):421-30. Review

Goessling W, Zucker SD. 2000. Role of apolipoprotein D in the transport of bilirubin in plasma. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 279(2):G356-65.

Gordon JW, Chesa PG, Nishimura H, Rettig WJ, Maccari JE, Endo T, Seravalli E, Seski T, Silver J. 1987. Regulation of THY-1 gene expression in transgenic mice. *Cell* 50 : 445-452

Gottsch.J.T, Bowers.A.L, Margulies.E.H, Seitzman.G.D, Sean W. Kim, Saurabh Saha, Albert S. Jun, Walter J. Stark, and Sammy H. Liu. 2003. Serial Analysis of Gene Expression in the Corneal Endothelium of Fuchs' Dystrophy. *Investigative Ophthalmology and Visual Science.*44:594-599

Hansen.L, Gaster.M, Oakeley.E.J, Brusgaard.K, Damsgaard Nielsen.E.M, Henning Beck-Nielsen, Oluf Pedersen and Brian A. Hemmings.2004. Expression profiling of insulin action in human myotubes: induction of inflammatory and pro-angiogenic pathways in relationship with glycogen synthesis and type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 323(2):685-95

Hardingham GE, Bading H. 2002. Coupling of extrasynaptic NMDA receptors to a CREB shut-off pathway is developmentally regulated. *Biochim Biophys Acta.* 1600(1-2):148-53

Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. 1999. Astrocytes: glutamate producers for neurons *J Neurosci Res.* 15; 57(4):417-28. Review

He X, Jittiwat J, Kim JH, Jenner AM, Farooqui AA, Patel SC, Ong WY. 2009. Apolipoprotein D modulates F2-isoprostane and 7-ketocholesterol formation and has a neuroprotective effect on organotypic hippocampal cultures after kainate-induced excitotoxic injury. *Neurosci Lett.* 455(3):183-6.

Hol EM, Roelofs RF, Moraal E, Sonnemans MA, Sluijs JA, Proper EA, de Graan PN, Fischer DF, van Leeuwen FW.2003. Neuronal expression of GFAP in patients with Alzheimer pathology and identification of novel GFAP splice forms. *Mol Psychiatry.* 8(9):786-96.

Hunter.S, MD, Young.A, MD, PHD, Olson.J, MD, Daniel J, Brat, MD, Bowers.G, Josiah N, Wilcox, PHD, Jaye.D,MD, PHD, Mendrinos.S, MD, and Neish.A ,MD. 2002. Differential expression between Pilocytic and Anaplastic Astrocytomas: Identification of

Apolipoprotein D as a marker for low-grades, Non-infiltrating Primary CMS Neoplasmas. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 275-281

James RW, Martin B. and Pometta D. 1986. Apoprotein D in a healthy, male population and in male myocardial infarction patients and their male, first-degree relatives. *Atherosclerosis* 60(1): 49-53

Jarrier.M.A, Ievy.G, Wald.R, Polonovski.J. 1963. Separation by ultracentrifugation of the alpha-lipoprotein of normal human serum. *Bull. Soc.Chim.Biol* 45: 349-359

Jones CA, Zempléni E, Davis B, Reynolds GP. 1993. Glutamate stimulates dopamine release from cortical and limbic rat brain in vitro. *Eur J Pharmacol.* 28; 242(2):183-7.

Jin D, El-Tanani M, Campbell FC. 2006. Identification of apolipoprotein D as a novel inhibitor of osteopontin-induced neoplastic transformation. *Int J Oncol.* 29(6):1591-9.

Kaasinen K, Koistinaho J, Alhonen L Nd Janne J. 2000. Overexpression of spermidine/spermine N-acetyltransferase in transgenic mice protects the animals from kainate-induced toxicity. *Eur J Neurosci.* 12(2): 540-8

Kalman J., McConathy W., Araoz C., Kasa P. and Lacko AG. 2000. Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia. *Neurol Res.* 22(4): 330-6

Keyse SM, Tyrrell RM. 1989. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 99-103

Kim WS., Wong J., Weickert CS., Webster MJ., Bahn S. and Garner B. 2009. Apolipoprotein-D expression is increased during development and maturation of the human prefrontal cortex. *J Neurochem.* 109(4):1053-66

Koenig HL, Gong WH, Pelissier P. 2000. Role of progesterone in peripheral nerve repair. *Rev Report* 5: 189-199

Koutsilieri E, Riederer P. 2007. Excitotoxicity and new antigitamatergic strategies in Parkinson's disease and Alzheimer's disease. *Parkinsonism Relat Disord.* 13 Suppl 3:S329-31. Review

Lagrande.M, Curtis-Prior.P.B (Ed). 1998. Prostaglandis Biology and Chemistry of prostaglandins and Related Eicosanoïdes, Church ill- Livingston PP.1-7

Lambert J, Provost PR, Marcel YL, Rassart E.1993. Structure of the human apolipoprotein D gene promoter region. *Biochim Biophys Acta.* 1172(1-2): 190-2

Lewohl JM, Wang l, Miles MF. 2000. Gene expression in human alcoholism: Microarray analysis of frontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res.* 24(12):1873-82

Lee HG, Kim H, Oh WK, Yu KA, Choe YK, Ahn JS, Kim DS, Kim SH, Dinarello CA, Kim K, Yoon DY. 2004. Tetramethoxy hydroxyflavone p7F downregulates inflammatory mediators via the inhibition of nuclear factor kappaB. *Ann N Y Acad Sci.* 1030:555-68.

Lisovsky.M, Hoang.M.P, Dresser.K.A, Kapur.P, Bhawan.J, Mahalingam.M, 2007. Apolipoprotein D in CD34-positive and cd34-negative cutaneous neoplasms: a useful marker in differentiating superficial acral fibromyxoma from dermatofibrosarcoma protuberans. *Modern Pathology.* 1030:555-68

Liu Z, Chang GQ, Leibowitz SF. 2001. Apolipoprotein D interacts with the long-form leptin receptor: a hypothalamic function in the control of energy homeostasis. *FASEB J* 15: 1329-1331

Lopez-Boado.Y.S, Tolivia.J and Lopez-Otin.C.1994. Apolipoprotein D gene induction by retinoic acid is concomitant with growth arrest and cell differentiation in human breast cancer cells. *Biol. Chem.* 43: 26871-26878

McAdoo DJ, Xu G, Robak G, Hughes MG, Price EM. 2000. Evidence that reversed glutamate uptake contributes significantly to glutamate release following experimental injury to the rat spinal cord. *Brain Res.* 26;865(2):283-5

McConathy.W, Alaupovic.P, 1973. Isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system, *FEBS Lett.* 37: 178-182

McConathy.W, Alaupovic.P. 1976. Study on the isolation and partial characterization of apolipoprotein D: a new protein moiety of the human plasma. *Biochemistry*15: 515-520

Montpied P, de Bock F, Lerner-Natoli M, Bockaert J, Rondouin G.1999.Hippocampal alterations of apolipoprotein E and D mRNA levels in vivo and in vitro following kainate excitotoxicity. *Epilepsy Res* 35(2):135-46

Muffat J., Walker D. and Benzer S. 2008. Human ApoD, an apolipoprotein up-regulated in neurodegenerative diseases, extends lifespan and increases stress resistance in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(19): 7088–7093

Mukherjee PK, DeCoster MA, Campbell FZ, Davis RJ, Bazan NG. 1999. Glutamate receptor signaling interplay modulates stress-sensitive mitogen-activated protein kinases and neuronal cell death, *J Biol Chem.* 5;274(10):6493-8

Nadler JV, Shelton DL, Perry BW, Cotman CW.1980. Regional distribution of [3H] kainic acid after intraventricular injection. *Life Sci.* 14;26(2):133-8

Navarro A, Tolivia J, Astudillo A, Del Valle E. 1998. Pattern of apolipoprotein D immunoreactivity in human brain. *Neurosci Lett.* 254: 17-20

O'Callaghan JP, Jensen KF. Enhanced expression of glial fibrillary acidic protein and the cupric silver degeneration reaction can be used as sensitive and early indicators of neurotoxicity. 1992. *Neurotoxicology*. 13 (1):113-22. Review

Olney J.W, Vesela Rhee and Oi Lan Ho. 1974. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Res* 13;77(3):507-12

Oltvai, Z.N, Millman, C.L, Korsmeyer S.J. 1993. Bcl-2 heterodimerized in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerated programmed cell death. *Cell* 74 , 609-619

Ong WY, Lau CP, Lenong SK, Kumar U, Suresh S, Patel SC. 1999. Apolipoprotein D gene expression in the rat brain and light and electron microscopic immunocytochemistry of apolipoprotein D expression in the cerebellum of neonatal, immature and adult rats. *Neuroscience* 90: 913-922

Ong W.Y, YHe, S.Suresh, S.C.Patel. 1997. Differential expression of Apolipoprotein D and Apolipoprotein E in The Kainic acid-lesioned rat hippocampus, *Neuroscience* 79. 359-367

Ordoñez C., Navarro A., Perez C., Astudillo A., Martínez E. and Tolivia J. 2006. Apolipoprotein D expression in substantia nigra of Parkinson disease. *Histol Histopathol* 21, 361-366.

Pasinetti GM, Aisen PS. 1998. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain *Neuroscience*. 87(2):319-24

Patel RC, Lange D, McNathy WJ, Patel YC, Patel SC. 1997. Probing the structure of the ligand binding cavity of lipocalins by fluorescence spectroscopy. *Protein Eng*. 10: 621-625

Pearlman W.H, Gueriguin J.L, Sawyer M.E. 1973. A specific progesterone-binding component of human breast cyst fluid, *J.Biol. Chem* 248: 5736-5741

Peitch MC, Boguski MS. 1990. Is apolipoprotein D a mammalian bilinbinding protein? *New Biol* 2: 197-206

Penkowa M, Florit S, Giralt M, Quintana A, Molinero A, Carrasco J, Hidalgo J. 2005. Metallothionein reduces central nervous system inflammation, neurodegeneration, and cell death following kainic acid-induced epileptic seizures. *J Neurosci Res* 15;79(4): 522-34

Provost PR, Marcel YL, Milne RW, Weech PK, Rassart E. 1991. Apolipoprotein D transcription occurs specifically in nonproliferating quiescent and senescent fibroblast cultures. *FEBS Lett*. 290 : 139-141

- Provost.P.R, Tremblay.Y, El-Amine.M and Bélanger.A.1995. Guinea pig apolipoprotein D RNA diversity and developmental and gestational modulation of mRNA levels. 1995. *Molecular and Cell Endocrinology* 109: 225-236
- Provost.P.R, Tremblay.Y, El-Amine.M, Bélanger.A. 1995. Guinea pig apolipoprotein D RNA diversity, and developmental and gestational modulation of mRNA levels, *Mol. Cell. Endocrinol.* 109; 225-236
- Provost.P.R, Villeneuve.L, Weech.P.K, Milne.R.W, Marcel.Y.L, Rassart.E. 1991. Major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization. *J.Lipids Res* 32: 1959-1970
- Provost.P.R, Weech.P.K, Tremblay.N.M, Marcel.Y.L, Rassart.E. 1990. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J. Lipid Res* 31: 2057-2056
- Puglielli L, Tanzi RE, Kovacs DM. 2003. Alzheimer's disease: the cholesterol connection. *Nat Neurosci* 6 : 345-351
- Purnima P. Desai, Hugh C. Hendrie, Rebecca M. Evans, Jill R. Murrell, Steven T. DeKosky, M. Ilyas Kamboh.2003. *Neuropsychiatric Genetics* 116B: 98-101
- Rassart.E, Bedirian.A, D Carmo.S, Guinard.O, Srois.J, Terrisse.L, Milne.R. 2000. Apolipoprotein D, *Biochim. Biophys. Acta* 1482: 185-198
- Ravizza T, Rizzi M, Perego C, Richichi C, Veliskova J, Moshé SL, De Simoni MG, Vezzani A.2005. Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. *Epilepsia* 46 Suppl 5: 113-7
- Reindl M, Knipping G, Wicher I, Dilitz E, Egg R, Deisenhammer F, Berger T.2001. Increased intrathecal production of apolipoprotein D in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 119: 327-332
- Rickhag.M, Dierborg.T, Patel.S, Ruscher.K, Wieloch.T. 2008. Apolipoprotein D is elevated in oligodendrocytes in the peri-infarct region after experimental stroke: influence of enriched environment. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 28:551-562
- Robel P, Young J, Corpéchet C, Mayo W, Perché F, Haug M, Simon H and Baulieu EE. 1995. Biosynthesis and assay of neurosteroids in rats and mice: functional correlates. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 53(1-6):355-60
- Rogers J, Lue LF. 2001. Microglial chemotaxis, activation, and phagocytosis of amyloid beta-peptide as linked phenomena in Alzheimer's disease *Neurochem Int.* 39(5-6):333-40. Review

- Rojo JV, Gonzalez LO, Lameles ML, Merino A, Vizoso F. 2001. Apolipoprotein D expression in endometrial carcinomas. *Acta Obstet Gynecol Scand* 80: 758-161
- Saito M, Smiley J, Toth R. 2002. Microarray analysis of gene expression in rat hippocampus after chronic ethanol treatment. *Neurochem Res* 27(10): 1221-9
- Sanchez D, Ganfomina MD, Bastiani MJ. 2000. Lazarillo, a neuronal lipocalin in grasshoppers with a role in axon guidance. *Biochim Biophys Acta* 1482: 102-109
- Sanchez D, Ganfomina M.D, Martinez S. 2002. Expression pattern of the lipocalin apolipoprotein D during mouse embryogenesis. *Mech. Dev.* 110: 225-229
- Sanchez D., Lopez-Arias B., Torroja L., Canal I., Wang X., Bastiani M., Ganfomina M. 2006. Loss of Glial Lazarillo, a homolog of Apolipoprotein D, Reduce lifespan and Stress Resistance in *Drosophila*. *Current Biology* 16:680-686.
- Scarpini E, Scheltens P, Feldman H. 2003. Treatment of Alzheimer's disease: current status and new perspectives. *Lancet Neurol.* 2(9): 539-47
- Schwob J.E, Fuller T., Price J.L. and Olney J.W. 1980. Widespread patterns of neuronal damage following systemic or intracerebral injections of kainic acid: a histological study. *Neuroscience.* 5(6):991-1014.
- Séguin D., Desforges M., Rassart E. 1995. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Molecular Brain Res* 30 : 242-250
- Shimohama S. Apoptosis. 2000. Apoptosis in Alzheimer's disease--an update. 5(1):9-16.
- Simard J, Dauvois S, Haagenen DE, Levesque C, Meren Y, Labine F. 1990. Regulation of progesterone-binding breast cyst protein GCDP-24 secretion by estrogens and androgens in human breast cancer cells: a new marker of steroid action in breast cancer, *Endocrinology* 126: 3223-3231
- Simard J, de Launoit Y, Haagenen DE, Labrie F. 1992. Additive stimulatory action of glucocorticoids and androgens on basal and estrogen-repressed apolipoprotein D messenger ribonucleic acid levels and secretion in human breast cancer cells. *Endocrinology* 130: 1115-1121
- Simard J, Veilleux R, de Launoit Y, Haagenen DE, Labrie F. 1991. Stimulation of apolipoprotein D secretion by steroids coincides with inhibition of cell proliferation in human LNCaP prostate cancer cell. *Cancer Res* 51: 4336-4341
- Sladeczek F. 1987. Putative role of inositol phospholipid metabolism in neurons. *Biochimie.* 69(4): 287-96. Review

Smith, K.M., Lawn, J.N., Wilcox. 1990. Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin: cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J. Lipid Res.* 31: 995-1004

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. 2000. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 69:145-82. Review

Sonkusare SK, Kaul CL, Ramarao P. 2005. Dementia of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders—memantine, a new hope. *Pharmacol Res.* 51(1): 1-17. Review

Sperk G, Lassmann H, Baran H, Kish S.J, Seitelberger F and Hornykiewicz F. 1983. Kainic acid induced seizures: neurochemical and histopathological changes. *Neuroscience.* 10(4):1301-15

Sperk G, Lassmann H, Baran H, Seitelberger F, Hornykiewicz O. 1985. Kainic acid-induced seizures: dose-relationship of behavioural, neurochemical and histopathological changes. *Brain Res.* 15; 338(2):289-95.

Spreyer P, Schaal H, Kuhn G, Rth T, Unterbreck A, Oleck K, Muller H.W. 1990. Regeneration-associated high levels expression of apolipoprotein D mRNA in endoneurial fibroblast of peripheral nerve, *EMBO J.* 9: 2479-2484

Steyrer E, Kostner GM. 1998. Activation of lecithin-cholesterol acyltransferase by apolipoprotein D: comparison of proteoliposomes containing apolipoprotein D, A-I or C-I. *Biochim Biophys Acta* 958: 484-491

Steward O, Torre ER, Tomasulo R, Lothman E. 1991. Neuronal activity up-regulates astroglial gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88(15):6819-23.

Suresh S, Yan Z, Patel R.C, Patel Y.C, Shutish C, Patel . 1998. Cellular Cholesterol Storage in the Niemann-Pick Disease Type C Mouse Is Associated with Increased Expression and Defective Processing of Apolipoprotein D, *Journal of Neurochemistry* 70 (1), 242–251.

Tanaka S, Kondo S, Tanaka T and Yonemasu Y. 1988. Long-term observation of rats after unilateral intra-amygdaloid injection of kainic acid. *Brain Res* 25;463(1):163-7

Tauk DL, Nadler JV. 1985. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic acid-treated rats. *J Neurosci* 5(4):1016-22

Terrisse L, Poirier J, Bertrand P, Merched A, Visvikis S, Siest G, Milne R, Rassart E. 1998. Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer patients. *J Neurochem* 71: 1643-1650

Terrisse L, Seguin D, Bertrand P, Poirier J, Milne R, Rassart E. 1999. Modulation of apolipoprotein D and apolipoprotein E expression in rat hippocampus after entorhinal cortex lesion. *Brain Res Mol Brain Res* 70: 26-35

Terry RD. 1994. Neuropathological changes in Alzheimer disease. *Prog Brain Res*. 101:383-90

Thomas EA, Dean B, Pavey G, and J. Gregor Sutcliffe. 2001. Increased CNS levels of apolipoprotein D in schizophrenic and bipolar subjects: Implications for the pathophysiology of psychiatric disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4066-4071

Thomas EA, George RC, Sutcliffe JG. 2003. Apolipoprotein D modulates arachidonic acid signalling in cultured cells: implications for psychiatric disorders. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids* 69: 421-427

Thomas EA, Yao JK. 2007. Clozapine specifically alters the arachidonic acid pathway in mice lacking apolipoprotein D. *Schizophr Res*. 89(1-3):147-53.

Toscano CD, Kingsley PJ, Marnett LJ, Bosetti F. 2008. NMDA-induced seizure intensity is enhanced in COX-2 deficient mice. *Neurotoxicology*. 29(6):1114-20.

Vieira V, Lindstedt K, Schneider W, Vieira P.M.. 1995. Identification of a circulatory and oocytic avian apolipoprotein. *Mol. Rep. Dev.* 42; 443-446.

Vallee M, Mayo W, Darnaudery M, Corpechot C, Young J, Koehl M, Le Moal M, Baulieu EE, Robel P, Simon H. 1997. Neurosteroids: deficient cognitive performance in aged rats depends on low pregnenolone sulfate levels in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 14865-14870

Vass K, Berger M.L, Nowak T.S, Welch W.J. and Lassmann H. 1989. Induction of heat stress protein HSP70 in nerve cells after status epilepticus in the rat. *Neurosci. Lett* 100, 259-264

Vazquez J, Gonzalez L, Merino A, Vizoso F. 2000. Expression and clinical significance of apolipoprotein D in epithelial ovarian carcinomas. *Gynecol Oncol* 76: 340-347

Vijayaraghavan S, Hitman GA, Kopelman PG. 1994. Apolipoprotein-D polymorphism: a genetic marker for obesity and hyperinsulinemia. *Jclin Endocrinol Metab* 79(2): 568-70

Von Euler V.S, in: P.B.Curtis-Prior (Ed). 1988. *Prostaglandins Biology and Chemistry of prostaglandins and Related Eicosanoids*, Churchill Livingstone PP.1-7

Warden CH, Diep A, Taylor BA, Lusi A.J. 1992. Localization of the gene for apolipoprotein D on mouse chromosome 16. *Genomics* 12:851-852

Walker D., Muffat J., Rundel C. and Benzer S. 2006. Overexpression of a *Drosophila* Homolog of Apolipoprotein D Leads to Increased Stress Resistance and Extended Lifespan. *Current Biology*. 16: 674-679.

Watkins JC. 1981. Pharmacology of excitatory amino acid transmitters *Adv Biochem Psychopharmacol*. 29:205-12. Review

Weaver CE Jr, Marek P, Park-Chung M, Tam SW, Farb DH. 1997. Neuroprotective activity of a new class of steroidal inhibitors of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16;94(19):10450-4

Yang CY, Gu ZW, Blanco-Vaca F, Gaskell SJ, Yang M, Massey JB, Gotto AM Jr, Pownall HJ. 1994. Structure of human apolipoprotein D: locations of the intermolecular and intermolecular disulfide links. *Biochemistry* 33: 12451-12455

Yao Y, Vieira A. 2002. Comparative 17beta-estradiol response and lipoprotein interactions of an avian apolipoprotein. *Gen Comp Endocrinol*. 1; 127(1):89-93.

Yao JK, Thomas EA, Reddy RD, Keshavan MS. 2005. Association of plasma apolipoproteins D with RBC membrane arachidonic acid levels in schizophrenia. *Schizophr Res*. 1; 72(2-3):259-66.

Yoshida K, Cleaveland ES, Nagle JW, French S, Yaswen L, Ohshima T, Brady RO, Penchev PG, Kulkarni AB. 1996. Molecular cloning of the mouse apolipoprotein D gene and its upregulated expression in Niemann-Pick disease type C mouse model. *DNA Cell Biol*. 15: 873-88.

Zemlan FP, Mulchahey JJ, Gudelsky GA. 2003. Quantification and localization of kainic acid-induced neurotoxicity employing a new biomarker of cell death: cleaved microtubule-associated protein-tau (C-tau). *Neuroscience*. 121(2):399-409.

Zeng C, Spielman AI, Vowels BR, Leyden JJ, Biemann K, Preti G. 1996. A human axillary odorant is carried by apolipoprotein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6626-6630

Zhang JW, Deb S, Gottschall PE. 1998. Regional and differential expression of gelatinases in rat brain after systemic kainic acid or bicuculline administration. *Eur J Neurosci*. 10(11): 3358-68

Zhang Z, Biesiadecki BJ, Jin JP. 2006. Selective deletion of the NH2-terminal variable region of cardiac troponin T in ischemia reperfusion by myofibril-associated mu-calpain cleavage. *Biochemistry*. 26;45(38):11681-94